

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Lenka Stupecká

Indukce tvorby hlíz u spontánně tuberizující linie bramboru:

úloha sacharidů a mobilních transkriptů

Tuber induction in spontaneously tuberizing potato line:

the role of saccharides and mobile transcripts

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Mašková, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala RNDr. Petře Maškové, Ph.D. za odborné rady, podporu, zajímavé diskuze, vstřícnost a rozhodně také za trpělivost a čas, který mi věnovala při vedení mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala RNDr. Tomášovi Maškovi, Ph.D. za zaučení do základních metod molekulární biologie, odborné rady, ochotu a čas věnovaný konzultacím.

Ráda bych poděkovala také doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za inspiraci, odborné rady, podporu a vstřícnost, kterou mi věnovala.

Dík patří i celému týmu laboratoře 007 za ochotu vždy pomoci i přátelskou atmosféru.

V neposlední řadě můj velký dík patří mým rodičům, kteří mě vždy podporovali a povzbuzovali. Děkuji jim za jejich trpělivost, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji také sestře, její rodině, Romanovi a všem, kteří mě podporovali.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Abstrakt

Brambory jsou jednou z nejvýznamnějších zemědělských plodin a je snaha zvýšit a zkvalitnit výnosy hlíz mj. objasněním mechanismů, které proces zakládání hlíz regulují. Tuberizace bramboru je morfogenetický proces, při kterém se hlízy vytvářejí z podzemní části stonku – stolonu. Správné načasování tohoto procesu je řízeno komplexní regulační sítí a ovlivňováno mnoha jak vnitřními, tak vnějšími faktory. Za příznivých podmínek dochází ke vzniku signálu v listech, který je transportovaný „floémovou superdálnicí“ poháněnou sacharidy do stolonu, kde tento signál iniciuje buněčné dělení, expanzi a změny v orientaci růstu buněk. Vývoj hlízy je ovlivňován řadou biochemických a morfologických procesů, regulován komplexní sítí genů, k jejichž expresi dochází v různých částech rostliny.

Tato práce byla zaměřena na rostliny *Solanum tuberosum*, kultivaru Lada a z něho odvozenou spontánně tuberizující mutantní linii D69, u které jedinou stálou doposud detekovanou změnou je chybějící izoforma mangan stabilizujícího proteinu (MSP). U těchto rostlin jsem se snažila zmapovat procesy související s produkcí sacharidů v listech (fotosyntetické charakteristiky – rychlost fotosyntézy, míru fluorescence, obsah fotosyntetických pigmentů a antokyanů), stanovit obsah sacharidů v listech a transport sacharidů floémem. Dále jsem se snažila určit změny v produkci a mobilitě vybraných složek tuberizačního signálu (floém-mobilních transkriptů) a na základě získaných dat odhadnout míru jejich odpovědnosti za fenotypový projev studované mutantní linie D69. Zdá se, že ačkoliv jsou zasaženy v primární fázi fotosyntézy, dokáží mutantní rostliny D69 tento zásah zdárně kompenzovat. V listech rostlin D69 se akumuluje více sacharidů než v listech rostlin Lada, ale množství sacharidů transportovaných floémem je u D69 nižší. Dále jsem metodou qRT-PCR analyzovala hladinu transkriptů genů zapojených v regulaci tuberizace bramboru: *StBEL5*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StBEL11*, *StBEL29* a *StSP5G*. Transkripty většiny sledovaných genů (vyjma represoru tuberizace *StSP5G*) jsou za dlouhodobých podmínek (LD) navýšeny, jak v listech, tak ve stolonu mutantních rostlin D69 oproti rostlinám Lada, což ukazuje na zvýšený tuberizační potenciál mutantních rostlin za podmínek LD. Na základě dosažených výsledků se zdá, že nemusí existovat očekávaný přímý vztah mezi silou floémového toku, mobilitou vybraných transkriptů a zvýšeným tuberizačním potenciálem mutantních rostlin.

Abstract

Potato is one of the most important agricultural crops and there is an attempt to increase and improve yields of tubers, among other things, by elucidation of the mechanisms that regulate the process of tuber induction. Potato tuberization is a morphogenetic process in which the tubers are formed from the underground parts of the stem – stolons. The correct timing of this process is controlled by a complex regulatory network and influenced by many internal and external factors. Under favourable conditions, an inductive signal is generated in the leaves and it is transported to the stolon by a "phloem information superhighway" driven by carbohydrates flow. The signal triggers cell division, expansion, and changes in the cell growth orientation in the stolon. The development of tubers is influenced by number of biochemical and morphological processes driven by a regulatory network of genes that are expressed in different parts of plants.

This work was focused on *Solanum tuberosum*, Lada cultivar and its derived D69 mutant line with lacking isoform of manganese-stabilizing protein (MSP), which is so far the only dissimilarity identified under all tested conditions. I aimed to map the processes related to the production of carbohydrates in leaves (photosynthetic characteristics - rate of photosynthesis and fluorescence, contents of photosynthetic pigments and anthocyanins) and to determine also carbohydrate contents in leaves and their transport by phloem. I also focused on the evaluation of changes in production and mobility of the selected components of tuberization signal (phloem-mobile transcripts) and based on this I attempted to estimate their impact on mutant phenotype. It appeared that although the plants of the mutant line were impaired in the primary phase of photosynthesis they could compensate for it well. Mutant plants accumulated more carbohydrates in leaves than control plants, however, the amount of carbohydrates transported by phloem was lower in D69. Further, transcript levels of the genes involved in potato tuber onset: *StBEL5*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StBEL11*, *StBEL29* and *StSP5G*, were analyzed. Transcript levels of most genes (with the exception of the tuber repressor *StSP5G*) were elevated under long-day conditions in both, leaves and stolons of mutant D69 plants, indicating their increased tuber capacity compared to Lada. Based on the results achieved, it seems that the expected tight relationship between the strength of phloem flow, mobility of selected transcripts and increased tuberization potential of mutant plants may not exist.

Klíčová slova: tuberizace bramboru, spontánně tuberizující linie D69, floémový tok, sacharidy, mobilní transkripty

Key words: potato tuberization, spontaneously tuberizing line D69, phloem flow, carbohydrates, mobile transcripts

Seznam použitých zkratek

AGL8	Agamous-like MADS-box protein
ANOVA	Analysis of variance
ARF8	Auxin response factor 8
AtCO	CONSTANS <i>A. thaliana</i>
bp	base pairs
BvFT1	Flowering locus T-like protein FT1 <i>Beta vulgaris</i>
BvFT2	Flowering locus T-like protein FT2 <i>Beta vulgaris</i>
Bzip	Basic leucine zipper domain
CDC	Cell-division-cycle
cDNA	complementary DNA
CFDA	carboxyfluorescein diacetate
CO	CONSTANS
CO₂	oxid uhličitý
ddH₂O	ultra čistá voda
DEPC	diethylpyrokarbonát
dH₂O	destilovaná voda
DMF	dimetylformamid
dNTP	směs deoxyribonukleotidů pro PCR
DW	dry weight
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eEF1α	eukaryotic translation Elongation factor 1 alpha
FD	FLOWERING LOCUS D
FPF	Flowering promoter factor
FT	FLOWERING LOCUS T
G2	floém specifický transkripční faktor
GA	Gibereliny
HPLC	high-performance liquid chromatography
ChlA	chlorofyl a

ChlB	chlorofyl b
K₂EDTA	draselná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
Kar	karotenoidy
KNOX	KNOTTED-like homeobox genes
LD	long day
LPA	linear polyacrylamide
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
MS médium	Murashige a Skoog médium
MSP	Manganese stabilizing protein
NaOAc	octan sodný
PCR	polymerase chain reaction
PSII	fotosystém II
PsbO1	izoforma mangan stabilizujícího proteinu
PTB	Polypyrimidine tract-binding protein
qRT-PCR	quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction
RbcS2	Ribulose biphosphate carboxylase small chain 2
RP6	random hexamer primer
RT(-)	minus reverse transcriptase control
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
SAM	stonkový apikální meristém
SD	short day
SLA	specific leaf area
StBEL11	BEL1-related homeotic protein 11 <i>Solanum tuberosum</i>
StBEL29	BEL1-related homeotic protein 29 <i>Solanum tuberosum</i>
StBEL5	BEL1-related homeotic protein 5 <i>Solanum Tuberosum</i>
StCDF1	Cycling DOF faktor 1 <i>Solanum tuberosum</i>
StCO	CONSTANS <i>Solanum tuberosum</i>
StFDL	FLOWERING LOCUS D-LIKE <i>Solanum tuberosum</i>

StGA20Ox1	GA 20-oxidase <i>Solanum tuberosum</i>
StGA2Ox1	GA2-oxidase <i>Solanum tuberosum</i>
StmiR172	microRNA 172 <i>Solanum tuberosum</i>
StPIN1	PIN-FORMED1 <i>Solanum tuberosum</i>
StPIN4	PIN-FORMED 4 <i>Solanum tuberosum</i>
StPOTH1	Potato Homeobox1 <i>Solanum tuberosum</i>
StPTB1	Polypyrimidine tract-binding protein 1 <i>Solanum tuberosum</i>
StPTB6	Polypyrimidine tract-binding protein 6 <i>Solanum tuberosum</i>
StSP3D	SELF PRUNING 3D <i>Solanum tuberosum</i>
StSP5G	SELF PRUNING 5G <i>Solanum tuberosum</i>
StSP6A	SELF PRUNING 6A <i>Solanum tuberosum</i>
StSUT1	Sucrose transport protein-like <i>Solanum tuberosum</i>
StSUT4	Sucrose transporter 4 <i>Solanum tuberosum</i>
StTFL1	TERMINAL FLOWER 1 <i>Solanum tuberosum</i>
SUC2	Sucrose-proton symporter 2
SUT2	Sucrose transporter 2
TAC	Tuberigen activation complex
TAE	Tris Acetate-EDTA
UBI	polyubiquitin
ÚEB	Ústav experimentální botaniky AV ČR
WT	Wild Type

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Literární přehled.....	14
2.1. Tuberizace	14
2.1.1. Inicie tuberizace	14
2.1.2. Indukční faktory	14
2.2. Mobilní signály indukce tuberizace	15
2.2.1. Induktory tuberizace	15
2.2.2. Represory tuberizace	17
2.3. Transport mobilního signálu floémem	19
2.3.1. Floém.....	19
2.4. Regulace iniciace tuberizace ve stolonu	21
2.5. Spontánně tuberizující mutantní linie D69	22
3. Materiál a metody.....	26
3.1. Materiál	26
3.2. Kultivace rostlin	26
3.2.1. Kultivace <i>in vivo</i>	26
3.2.2. Kultivace <i>in vitro</i>	26
3.3. Experimenty	28
3.3.1. Stanovení fotosyntetických charakteristik.....	28
3.3.2. Stanovení produkce látek v listech a jejich pohybu floémem	30
3.4. Zpracování dat.....	42
4. Výsledky	43
4.1. Stanovení fotosyntetických charakteristik	45
4.1.1. Měření fluorescence chlorofylu a	45
4.1.2. Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů	46
4.1.3. Stanovení antokyanů	47
4.1.4. Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy	49
4.2. Stanovení obsahu rozpustných sacharidů v listech a ve floému	50
4.2.1. Obsah rozpustných sacharidů v listech.....	50
4.2.2. Obsah rozpustných sacharidů ve floémových exudátech	51
4.3. Stanovení množství vybraných mobilních transkriptů v pletivech a ve floému ..	54
4.3.1. Navržení vhodných primerů pro qRT-PCR.....	54
4.3.2. Optimalizace použití referenčních transkriptů	56
4.3.3. Vyhodnocení qRT-PCR.....	61

5. <i>Diskuze</i>	72
5.1. Mutantní linie D69	72
5.2. Fotosyntetické charakteristiky rostlin D69 a Lada.....	72
5.3. Obsah sacharidů v listech a ve floému rostlin.....	74
5.4. Mobilní transkripty.....	78
5.5. Tok sacharidů a mobilní transkripty	84
6. <i>Závěr</i>	86
7. <i>Seznam použité literatury</i>	87

1. Úvod

Lilek brambor je třetí nejdůležitější plodinou světa z hlediska lidské spotřeby, a to po rýži a pšenici. Více než miliarda lidí po celém světě konzumuje hlízy brambor a celková produkce plodiny přesahuje 374 milionů tun. Tuberizace bramboru je důležitý morfogenetický proces, při kterém se z podzemní části stonku, stolonu, vytvářejí hlízy. Hlízy slouží jako zásoba živin, která umožňuje rostlině přežít zimu a později se rozmnožovat. Divoké poddruhy vytvářejí hlízy striktně v závislosti na fotoperiodě, tedy za podmínek krátkého dne a dlouhé noci, zatímco nově šlechtěné genotypy jsou schopné tuberizovat relativně nezávisle na délce dne. Pro šlechtění takových genotypů a celkové zkvalitnění výnosů hlíz je klíčové prohlubující se porozumění mechanismům regulace tuberizace. Pro tyto účely jsou mutantní rostliny D69, vzhledem k jejich schopnosti spontánně tuberizovat, vhodným experimentálním materiálem. Tato práce je zaměřena na porovnání produkce sacharidů, s tím spojené síly floémového toku a hladin transkriptů vybraných složek terigenního signálu a jejich mobility u kontrolních a mutantních rostlin a pochopení vztahu mezi jednotlivými sledovanými charakteristikami.

Hypotézy

- ❖ Zásah do primární fáze fotosyntézy mutantních rostlin ovlivní fotosyntetické charakteristiky rostlin a následně produkci sacharidů v listech
- ❖ Zvýšený obsah sacharidů v listech může vést ke zvýšenému transportu sacharidů floémem a tím k rychlejšímu nástupu tuberizace
- ❖ S vyšším množstvím sacharidů transportovaných floémem se do stolonu z listu transportuje vyšší množství mobilních signálů, což ovlivní indukci tuberizace mutantních rostlin

Cíle

Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda je za fenotyp mutantní linie D69 zodpovědná změněná produkce a tok asimilátů po rostlině a zda, případně do jaké míry, je s tímto spojená změna produkce a transportu vybraných mobilních transkriptů.

Dílčí cíle:

- ❖ **Stanovení fotosyntetické charakteristik rostlin**
 - Stanovení fluorescence chlorofylu a, stanovení rychlosti čisté fotosyntézy, stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů a antokyanů v listech
- ❖ **Stanovení obsahu sacharidů v listech a hodnocení floémového toku**
 - Stanovení obsahu rozpustných sacharidů v listech
 - Stanovení síly floémového toku vyjádřeného jako množství sacharidů transportované za jednotku času
 - Stanovení hladiny transkriptů sacharózových transportérů *StSUT1* a *StSUT4*
- ❖ **Stanovení produkce a mobility vybraných složek tuberizačního signálu (*StBEL5*, *StSP6A*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP5G*)**
 - Stanovení hladiny transkriptů v listech a ve stolonu
 - Stanovení mobility transkriptů ve floému

2. Literární přehled

2.1. Tuberizace

2.1.1. Iniacie tuberizace

Jakmile je rostlina bramboru vystavena induktivním podmínkám, ve vyvinutých listech se vytvoří signál, který je floémem transportován z listů do stolonu/ů, kde iniciuje tvorbu hlízy. Iniacie tuberizace je spojena s ukončením elongačního růstu stolonu a následným radiálním růstem stolonové špičky a zvětšováním buněk, což koresponduje s růstem hlízy (Xu 1998). Iniacie tuberizace vyžaduje přesnou synchronizaci morfologických a biochemických procesů, které ovlivňuje řada vnějších a vnitřních faktorů (Hannapel et al., 2017; přehledně např. Rodríguez-Falcón et al., 2006). Faktory ovlivňující tuberizaci jsou víceméně podobné u většiny poddruhů bramboru, ale odlišné genotypy vykazují značné rozdíly v míře odpovědi na tyto faktory (Jackson 1999).

2.1.2. Indukční faktory

Mezi klíčové faktory vnějšího prostředí regulující iniciaci tuberizace patří např. fotoperioda (Batutis and Ewing 1982; Jackson 1996; Martínez-García et al., 2002; Hannapel 2013; přehledně např. v Rodríguez-Falcón et al., 2006; Sarkar 2010), teplota a množství dusíku v půdě (Jackson 1999; přehledně např. v Jackson 2009). Dále se na iniciaci tuberizace podílí fyziologický stav rostliny, např. hladina fytohormonů, metabolické rovnováhy (např. stav sacharidového metabolismu) a fáze ontogeneze (přehledně např. v Rodríguez-Falcón et al., 2006; Sarkar 2008; Aksenova et al., 2012). Fotoperiodické podmínky, konkrétně podmínky krátkého dne, pozitivně ovlivňují iniciaci tuberizace u všech bramborových kultivarů, ale např. divoký poddruh *Solanum tuberosum*, ssp. *andigena* podmínky krátkého dne pro tuberizaci striktně vyžaduje (Jackson 1999; přehledně např. Abelenda et al., 2011). Pro úspěšnost tuberizačního procesu je také velmi důležitý sacharidový status a distribuce sacharidů mezi jednotlivými orgány rostliny (Suárez-López 2013; přehledně např. v Smeeckens and Hellmann, 2014). Role fytohormonů v regulaci tuberizace je široce studována. Konkrétně gibereliny (GA) působí inhibičně na indukci tvorby hlíz (Koda and Okazawa 1983; Vreugdenhil and Sergeeva, 1999; přehledně např. v Aksenova et al., 2012).

Jak už bylo řečeno, významnou roli v iniciaci tvorby hlíz mají mobilní signály transportované z listů na dlouhou vzdálenost floémem (Hannapel et al., 2017). Mobilní signály zprostředkovávají informace o podmínkách vnějšího a vnitřního prostředí a mohou být různé podstaty, např. proteiny, mRNA, miRNA nebo fytohormony a sacharidy (Hannapel 2013; Hannapel et al., 2017; přehledně např. v Sarkar 2008; Dutt et al., 2017).

2.2. Mobilní signály indukce tuberizace

Mezi důležité mobilní signály, které jsou transportované z listů do stolonu a které se řadí mezi pozitivní regulátory tuberizace, patří protein StSP6A (homolog proteinu FT *A. thaliana*) (Navarro et al., 2011) a RNA pro transkripční faktory StBEL5 a StPOTH1 (Chen et al., 2003; Banerjee et al., 2006; Lin et al., 2013). Další doposud známé mobilní signály u bramboru jsou *StmiR172* (Martin et al., 2009) a GA. *StmiR172* indukuje tuberizaci (přehledně např. v Dutt et al., 2017). GA fungují jako represory tuberizace. Za podmínek dlouhého dne je reprimována exprese genu *GA20ox1*, který kóduje enzym katalyzující syntézu aktivních C20 giberelinů (Suárez-López 2013; přehledně např. v Dutt et al., 2017). Dále se mezi mobilní signály ovlivňující tuberizaci řadí RNA transkripčních faktorů StBEL11 a StBEL29, které jsou sekvenčně podobné transkripčnímu faktoru StBEL5. Bylo zjištěno, že exprese genů *StBEL29* a *StBEL11* je zesílena za krátkého dne a funkce jejich produktů je antagonistická k funkci StBEL5 při tvorbě hlíz (Ghate et al., 2017).

2.2.1. Induktory tuberizace

2.2.1.1. FT-like induktory

Fotoperiodická regulace tuberizace u bramboru sdílí společné znaky s fotoperiodickou regulací kvetení u *A. thaliana* (přehledně např. v Rodríguez-Falcón et al., 2006; Abelenda et al., 2014). Klíčovým vodítkem pro pochopení mechanismů fotoperiodické regulace tuberizace se stalo objasnění mechanismu regulace kvetení (Mathieu et al., 2007; Tamaki 2012; Lin et al., 2007; Corbesier et al., 2007; přehledně např. v Kobayashi and Weigel 2007). Kvetení i tuberizace odpovídají na signály (původně pojmenované „florigen“ a „tuberigen“), které vznikají v listech a jsou přenášeny do vzdálenějších orgánů rostliny (přehledně např. v Abelenda et al., 2014). Povaha florigenu, mobilního signálu

vznikajícího v listech a transportovaného floémem do stonkového apikálního meristému (SAM), kde iniciuje kvetení, byla po mnohaletém pátrání odhalena. Hlavní součástí florigenu je protein FLOWERING LOCUS T (Zeevaart 2006; přehledně např. v Kobayashi and Weigel 2007). Experimenty prováděné během minulého století rovněž potvrdily existenci fotoperiodického signálu zodpovědného za iniciaci tvorby hlízy (Jackson 1999; Hannapel et al., 2017). Za optimálních podmínek (krátký den, nízká teplota) je přes rouby přenositelný signál transportován z listů do stolonových špiček, kde iniciuje tuberizaci. Chailakhyan (1981) prováděl roubovací experimenty, aby dokázal zaměnitelnost signálů florigenu a tuberigenu (Hannapel et al., 2017). Rostlinu tabáku, která byla vystavena pro kvetení indukčním podmínkám, 0narouboval na podnož bramboru *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* zbavenou listů. Na podnoži se vytvořily hlízy za pro tuberizaci neinduktivních podmínek. Z experimentu lze vyvodit závěr, že florigenní mobilní signál je schopen indukovat tuberizaci (Suárez-López 2013; Hannapel et al., 2017).

StSP6A

Do rodiny FT proteinů, kromě florigenního proteinu FT *A.thaliana*, patří protein StSP3D, který je zodpovědný za kvetení u bramboru a protein StSP6A, který byl identifikován jako důležitá součást tuberigenního signálu (Navarro et al., 2011). Expres *StSP6A* byla nalezena v listech, vzrostných vrcholech stonku, květech, stolonech i hlízách. Jeho exprese je lokalizována především v průvodních buňkách floému v listech a ve stolonech a probíhá za podmínek LD (dlouhý den) i SD (krátký den), přičemž za podmínek SD je hladina transkriptu v listech podstatně vyšší než za podmínek LD. Expres *StSP6A* v listech tedy koreluje s indukčními podmínkami tuberizace. StSP6A je zahrnutý v kontrole tuberizace i u domestikovaných poddruhů bramboru, u nichž tuberizace není striktně závislá na podmínkách SD (Navarro et al., 2011).

2.2.1.2. *BELL* transkripční faktor a *POTH1*

Mezi další mobilní signály pohybující se floémem a iniciující tvorbu hlíz patří transkript genu *StBEL5* a transkript jeho KNOX interakčního partnera StPOTH1. Transkripční faktor StBEL5 vytváří s proteinem StPOTH1 heterodimer, který následně reguluje expresi cílových genů, které jsou zahrnuty v regulační tuberizační dráze. BEL5-POTH1 komplex se váže k tandemu TTGAC motivů přítomných jako upstream sekvence u cílových genů (Chen et al., 2003; Chen et al., 2004; Sharma et al., 2016). Transkripty genů *StBEL5* a *StPOTH1* jsou z listů transportovány floémem do stolonu.

Zvýšená exprese, pohyb a akumulace *StBEL5* RNA je spjata s časnou iniciací tuberizace a vyšším výnosem hlíz. Právě za podmínek krátkého dne je transport transkriptu *StBEL5* z listů do stolonu zesílen (Banerjee et al., 2006; Banerjee et al., 2009). Nedávná práce týkající se mobility transkriptu *StBEL5* ukázala, že v průvodních buňkách floému RNA *StBEL5* interaguje s proteiny z rodiny PTB (Polypyrimidine-tract binding proteins), StPTB1 a StPTB6. Tyto proteiny se váží na konzervované cytosin/uracil motivy na 3'UTR konec transkriptu *StBEL5*, tak zvyšují jeho stabilitu a usnadňují transport (Cho et al., 2015). V listech protein StBEL5 indukuje transkripci genů *StSP6A* a *StCDF1* (transkripční regulátor) (Sharma et al., 2016, Hannapel et al., 2017).

2.2.2. Represory tuberizace

2.2.2.1. *FT-like* represory

Proteiny kódované homology *FT*, jak již bylo prokázáno u *A. thaliana* (Hanzawa et al., 2005), nemusí vždy zastávat v procesu kvetení stimulační úlohu. U *Beta vulgaris* var. *vulgaris* (červené řepy) byly izolovány dva geny homologní k *FT*: *BvFT1* a *BvFT2*. Zjistilo se, že gen *BvFT1* je sekvenčně podobný *FT*, ale funguje jako represor kvetení. Zvýšená exprese *BvFT1* vedla u řepy i u *A. thaliana* k potlačení kvetení (Pin et al., 2010; přehledně např. v Jarillo and Piñeiro 2011). Fylogenetická větev, do které patří tyto geny (represory), zahrnuje i další homology genu *FT*, které jsou zahrnuty v tuberizačním procesu, např. *StSP5G* a *StTFL1* u *Solanum tuberosum*. Transgenní rostliny s nadměrnou expresí *StTFL1* v listech produkovaly více hlíz v porovnání s kontrolními rostlinami. StTFL1 tedy pravděpodobně stimulačně reguluje tuberizaci (Guo et al., 2010; Harig et al., 2012).

U kvetení *A. thaliana* a tuberizace *S. tuberosum* dochází v listech rostliny k příjmu a zpracování fotoperiodického signálu – další zpracování tohoto signálu je u obou procesů zprostředkováno proteinem CONSTANS (CO), transkripčním faktorem regulujícím expresi *FT/FT-like* genů. CO je transkripční regulátor, pro jehož aktivaci je nutné světlo. Hladina transkriptu *CO* je kontrolována cirkadiánními hodinami (Suarez-Lopez et al., 2001). Protein CO je na světle stabilní, zatímco ve tmě je degradován proteázami (Valverde et al., 2004). CO má DNA vazebnou aktivitu i transkripčně aktivační potenciál (Tiwari et al., 2010). Za SD podmínek u *A. thaliana* vrcholí exprese *AtCO* (*CONSTANS A. thaliana*) za tmy, protein CO tedy není akumulován a nedochází k expresi genu *FT*. Za LD podmínek vrcholí

exprese genu *CO* za světla, takže dochází k akumulaci proteinu, tedy ke stimulaci exprese genu *FT*, který iniciuje kvetení (přehledně např. v Searle and Coupland 2004).

U bramboru protein StCO v listech zprostředkovává regulaci tuberizace prostřednictvím ovlivnění exprese genu *StSP6A*. StCO je stabilizován a aktivován na světle při podmínkách LD, což vede k potlačení exprese *StSP6A*, zatímco za SD podmínek StCO stabilizován není, a tedy expresi *StSP6A* nepotlačuje a dochází k iniciaci tuberizace (přehledně např. v Searle and Coupland 2004).

StSP5G

Předpoklad, že produkt genu *StSP5G* je represor tuberizace, byl podpořen faktem, že u *S. tuberosum* spp *andigena* exprese *StSP5G* probíhá v listech za LD podmínek, tedy podmínek, kdy nedochází k tuberizaci (Navarro et al., 2011). Současná hypotéza předpokládá, že StCO reguluje expresi *StSP6A* prostřednictvím posílení transkripce genu *StSP5G*, jehož produkt působí jako represor genu *StSP6A*. U linií *StCO*-RNAi je inhibována exprese represoru *StSP5G*, a tak je indukována exprese *StSP6A* a dojde k tuberizaci za podmínek LD. Za SD podmínek je exprese genu *StSP5G* potlačena. Transkripce genu *StSP5G* tedy souvisí s akumulací proteinu StCOL1 (StCO) (Morris et al., 2014; Abelenda et al., 2016).

Za LD podmínek vykazuje exprese *StSP5G* dva expresní vrcholy. Větší z uvedených expresních vrcholů se překrývá s dobou, kdy je stabilizován protein StCOL1, což podporuje předpoklad, že StCOL1 stimuluje expresi *StSP5G* (Abelenda et al., 2016). ChIP-qPCR studie ukázaly, že se StCOL1 váže na p1 a p4 oblasti promotoru *StSP5G* za neinduktivních LD podmínek, ale neváže se na oblast promotoru *StSP6A*. Z toho vyplývá, že StCOL1 nepůsobí represi genu *StSP6A* přímo, ale přes aktivaci genu *StSP5G*. Umlčení genu *StSP5G* vede ke zvýšené expresi genu *StSP6A* v listech a tuberizaci za LD, což potvrzuje funkci StSP5G jako represoru tuberigenního signálu (Abelenda et al., 2016).

Jak z výše uvedeného vyplývá, mobilní tuberigenní signál je multikomponentní povahy a jeho součástí jsou mimo výše uvedených faktorů i další signální molekuly, které se transportují floémem do stolonu, kde společně interagují a s lokálními regulátory vytváří komplexní síť řídící iniciaci tuberizace (Hannapel et al., 2017, přehledně např. v Dutt et al., 2017).

2.3. Transport mobilního signálu floémem

2.3.1. Floém

Hlavním hnacím motorem transportu látek floémem, lýkovou částí cévního svazku, je gradient obsahu sacharidů podél transportní cesty floémem, tedy provázanost produkce a transportu mobilních signálů se sacharidovou bilancí je logická. Pro úspěšnou iniciaci tvorby hlízy je velmi důležitý sacharidový status a distribuce sacharidů po rostlině. Sacharidy nejsou pouze zdrojem energie, ale také působí jako signální molekuly, které jsou pravděpodobně součástí tuberigenního signálu (přehledně např. v Smeekens and Hellmann, 2014; Gibson 2005).

Transport sacharidů (sacharózy, popř. i hexózy) začíná ve fotosynteticky aktivních pletivech listu (zdroje), ze kterých jsou nakládány do floému a distribuovány do heterotrofních částí, např. kořenů, růstových vrcholů či zásobních orgánů (sinků). Proces nakládání produktů fotosyntézy (asimilátů) do sítkových elementů floému a jejich vykládání v sinku (vyvíjející se orgány, zásobní orgány) byl dobře prostudován (přehledně např. v Ayre 2011; Ham and Lucas 2014). Podstatou je tlakový gradient, který vznikne mezi místem nakládání do floému (zdrojem) a místem vykládání z floému (sinkem), který řídí hromadný tok sítkovicemi. Podle tohoto modelu se více látek dostane do silnějších sinků, protože zvýšená lokální spotřeba dopravovaných cukrů v sinkových orgánech zvyšuje tlakový gradient mezi zdrojovou oblastí a těmito sinky (přehledně např. v Turgeon and Wolf 2009). Do floému, respektive do sítkovic a průvodních buněk, se u bramboru sacharóza nakládá z extracelulárního prostoru listu za pomoci sacharózových transportérů SUT (Sucrose transporters) (přehledně např. v Ayre 2011).

Transport sacharózy přes membránu prostřednictvím sekundárního aktivního transportu je klíčový pro transport asimilátů a rozdělení uhlíku po těle vyšších rostlin. Geny kódující sacharózové transportéry se liší mírou exprese, subcelulární lokalizací a substrátovou afinitou. Hladina transportérů je regulována především na úrovni transkripce. U několika druhů, včetně bramboru, byla mRNA sacharózových transportérů detekována i ve floému (přehledně např. v Krügel and Kühn 2013; Liesche et al., 2011). Nakládání sacharózy do floému je velice dobře prostudovanou funkcí sacharózových transportérů. Sacharózové transportéry SUT1/SUC2 jsou lokalizovány na plazmatické membráně sítkových elementů nebo průvodních buněk a zajišťují transport sacharózy

z apoplastu. U *Solanaceae* exprese genu *SUT1* probíhá v průvodních buňkách a SUT1 jsou lokalizovány na plazmatické membráně sítkových elementů (Suárez-López 2013; přehledně např. v Liesche et al., 2011). Snížená exprese genu *StSUT1* u transgenních linií bramboru způsobila v časných fázích vývoje redukci výnosu hlíz. *StSUT1* se dále účastní vykládání asimilátů z floému také v hlízách během časných fází vývoje (Kuhn et al., 2003).

Další člen SUT rodiny, *StSUT4* pravděpodobně negativně ovlivňuje iniciaci tuberizace a mohl by se řadit mezi inhibitory tuberizace. Rostliny *StSUT4*-RNAi (*S.tuberosum* spp *andigena*) tuberizovaly i za neinduktivních podmínek dlouhého dne. Množství transkriptu genu *StCO* (CONSTANS) u transgenních rostlin bylo za podmínek dlouhého dne sníženo oproti WT, ale za podmínek krátkého dne bylo naopak zvýšeno. Inhibiční efekt *StCO* na míru exprese *StSP6A* za dlouhého dne byl tedy u transgenních rostlin vyrušen snížením množství transkriptu *StSUT4*. Fenotyp těchto rostlin je podobný fenotypu rostlin s redukovanou expresí *StGA20ox1*, genu kódujícího klíčový enzym zapojený v GA biosyntetické dráze (Carrera et al., 2000; Chincinska et al., 2008). Ačkoliv není funkce SUT4 v rostlinách plně objasněna, jeho možnou regulační úlohu naznačuje mimo jiné fakt, že SUT4 se může vázat se SUT1 (hlavní sacharózový exportér ve zdroji) a vytvořit méně efektivní heterodimer, čímž negativně ovlivní nakládání sacharózy ve zdroji, a tím i tuberizaci (Chincinska et al., 2008).

2.4. Regulace iniciace tuberizace ve stolonu

Tuberigenní signál, který vzniká za indukčních podmínek v listech a je transportovaný floémem, je v cílovém stolonu amplifikován. Jak se píše v předešlých kapitolách, mezi hlavní mobilní signály, které se transportují do stolonu, patří transkript *StBEL5*, *StPOTH1* a protein StSP6A. Do stolonu se také floémem transportují transkripty *StBEL11* a *StBEL29* (Ghate et al., 2017). Vzhledem k multikomponentní povaze tuberigenního signálu dochází k regulaci tuberizace prostřednictvím komplexní regulační sítě, ve které dochází k četným vzájemným interakcím mezi jednotlivými členy regulační dráhy, a to i v pletivech stolonu (přehledně v Dutt et al., 2017). U bramboru je protein StSP6A (FT) floémem do stolonu transportován z listů, zároveň je však exprese *StSP6A* stimulována mechanismem tzv. „autoregulační smyčky“, který udržuje syntézu přímo ve stolonu (Navarro 2011). U *A.thaliana* nebylo podobné navýšení exprese genu *FT* pomocí autoregulační smyčky nalezeno. U *A.thaliana* ve SAM vytváří protein FT komplex se svým interakčním partnerem, kterým je bZIP transkripční faktor FLOWERING LOCUS D (FD). Vytvořený komplex FT a FD iniciuje vývoj květu přes aktivaci transkripce genů květního meristému. Mutace *fd* vede ke zpoždění začátku kvetení a zabrání časnému kvetení u transgenních rostlin s konstitutivní expresí genu *FT* (Wigge et al., 2005; Jaeger et al., 2006).

U bramboru protein StSP6A ve špičce stolonu interaguje prostřednictvím proteinu 14-3-3 s interakčním partnerem – proteinem FLOWERING LOCUS D-LIKE (StFDL) a utvoření tohoto komplexu TAC (tuberigen activation complex) umožní indukci tuberizace. Exprese genu *StFDL* probíhá přednostně ve stolonu. U *StFDL*-RNAi rostlin nebyla ovlivněna exprese *StSP6A*, avšak tuberizace u těchto rostlin byla výrazně zpožděna oproti kontrolním rostlinám (Teo et al., 2017).

Existuje model, který navrhuje protein StBEL5 jako hlavní regulátor, který ovlivňuje ostatní členy regulační sítě tuberizace. Naznačuje, že funkcí StBEL5 je přímo aktivovat tuberizaci a zároveň amplifikovat jak svůj vlastní signál, tak další důležité tuberizační signály (např. *StSP6A*, *StBEL11*, *StBEL29*) (Hannapel et al., 2017). Hladina mRNA genu *StSP6A* se ve stolonu zvýšila v závislosti na zvýšeném transportu RNA *StBEL5* z listů nebo na navýšení exprese genu *StBEL5* ve stolonu pomocí autoregulační smyčky. Rostliny s mutací v regulační oblasti genu *StSP6A* pro vazbu heterodimeru transkripčních faktorů (StBEL5 a StPOTH1) vykazovaly velmi nízkou expresi genu *StSP6A* ve stolonu i v nově vznikajících hlízách za indukčních podmínek

krátkého dne (Sharma et al., 2016). StSP6A indukuje expresi několika genů (*StPIN1*, *StPIN4*, *ARF8*, *FPF*, *CDC*, *StSUT1*, *AGL8*, *StGA2ox1*) (Navarro et al., 2011), z nichž všechny rovněž obsahují regulační upstream sekvence pro vazbu heterodimeru BEL5-POTH1 (Sharma et al., 2016). V počáteční fázi tuberizace dochází ve stolonu také k amplifikaci exprese *StBEL5*. Za indukčních podmínek krátkého dne heterodimer BEL5-POTH1 amplifikuje transkripci genu *StBEL5* navázáním na regulační upstream sekvence tohoto genu. Zmíněná autoregulační smyčka byla potvrzena použitím cílené mutagenese regulační sekvence pro vazbu dimeru BEL5-POTH1 (Lin et al., 2013). Transkripty genů *StBEL11* a *StBEL29* jsou z listů transportovány floémem do stolonu, kde přes tandemový upstream regulační element genu *StSP6A* působí StBEL11 a StBEL29 represivně na expresi *StSP6A*, tzn. StBEL11 a StBEL29 jsou negativními regulátory tuberizace. Supresivní účinek StBEL11 a StBEL29 na *StSP6A* pravděpodobně není zprostředkován přes aktivitu StBEL5. BEL5-POTH1 heterodimer rovněž aktivuje expresi genů *StBEL11* a *StBEL29* navázáním na jejich upstream regulační sekvence (Ghate et al., 2017; Hannapel et al., 2017). Aktivita promotorů těchto genů je indukována SD podmínkami v listech, řapících a stolonech. Akumulace transkriptů *StBEL11* a *StBEL29* byla nejvyšší za SD podmínek ve stolonech (Ghate et al., 2017). Vytváření hlízy (vyvíjející se sink) je vysoce bioenergeticky náročný proces, který vyžaduje účinnou koordinaci buněčného růstu. Ghate et al. (2017) navrhuje, že jelikož BEL11 a BEL29 mají v regulaci tuberizace antagonistickou funkci k BEL5 je možné, že při přechodu od stolonu k hlíze fungují regulačně v odlišné vývojové fázi nebo v odlišných typech buněk.

Bylo prokázáno, že StBEL5 a StPOTH1 regulují vývoj rostlin také prostřednictvím ovlivnění metabolismu giberelinů. GA inhibují tuberizaci za dlouhého dne. Vysoké množství GA ve špičce stolonu stimuluje prodlužování stolonu, zatímco snížená hladina GA je nutná pro iniciaci tuberizace (Xu et al., 1998). BEL5-POTH1 komplex se váže na regulační oblast genu *GA20ox1*, snižuje jeho expresi a tím snižuje hladinu GA (Chen et al., 2004).

2.5. Spontánně tuberizující mutantní linie D69

Spontánně tuberizující mutantní linie D69 byla odvozena týmem Dr. Hroudy (ÚEB, Praha), který linii poskytl Katedře fyziologie rostlin PřFUK. Mutantní linie D69 vznikla z linie *Solanum tuberosum* cv. Lada metodou náhodné aktivace genu, transformací gene trap konstruktem. Molekulární analýzou byla nalezena jediná T-DNA,

lokalizovaná do repetitivní nekódující rDNA intergenní oblasti genomu (Fischer et al., 2008). Z proteomické analýzy vyplynulo pouze několik orgánově specifických rozdílů (listy, stonky, kořeny) v množství některých proteinů u mutantů D69 proti kontrole. Proteiny, které byly v linii D69 přítomny ve vyšších hladinách oproti kontrole, byly členové patatinové rodiny a inhibitor cysteinproteáz (Fischer et al., 2008). Naproti tomu stálou změnou detekovanou v listech rostlin D69 je ztráta jedné izoformy mangan stabilizujícího proteinu MSP (PsbO1) fotosystému II. Isoforma proteinu MSP chyběla v listech rostlin D69 za všech testovaných podmínek (Fischer et al., 2008). Lze předpokládat, že protein MSP (PsbO) by mohl mít schopnost ovlivnit účinnost fotosyntézy, a tím i metabolismus sacharidů.

U rostlin D69 kultivovaných ve skleníku byl oproti kontrole stanoven signifikantně nižší výtěžek fluorescence chlorofylu a, což naznačuje zasažení primární fáze fotosyntézy rostlin D69 (Ševčíková et al., 2017). Rostliny D69 kultivované *in vitro* se dále liší od kontrolních rostlin větším množstvím antokyanů a mají kompaktnější habitus, mají kratší stonky, jejich stonky a listy jsou zbarveny tmavě zeleně až do fialova, a mají také redukovaný kořenový systém. Rozdíl zbarvení naznačuje změny obsahu pigmentů. U rostlin D69 bylo nalezeno průkazně více chlorofylu a, karotenoidů a xantofylů oproti kontrolním rostlinám (Ševčíková et al., 2017). Skleníkové rostliny D69 mají také kompaktnější habitus oproti kontrolním rostlinám a listy rostlin D69 se stávají rychleji chlorotickými, na rozdíl od listů rostlin D69 kultivovaných *in vitro* (Fischer et al., 2008).

Mutantní linie D69 disponuje silnou tendencí spontánně tuberizovat za podmínek *in vitro* i *in vivo*, a to i za neinduktivních podmínek. Kultivace rostlin D69 na médiu s 2,5% sacharózou vedla k výraznému snížení tuberizace. Vzhledem k tomu, že navýšením sacharidů v médiu z 2,5 na 3 % se výrazně zvýšila frekvence tuberizace, lze předpokládat, že k iniciaci tuberizace rostlina požaduje určité hraniční množství sacharózy (Fischer et al., 2008).

Fischer et al. (2008) testovali množství sacharidů v listech a stoncích u rostlin Lada a D69 rostoucích jak *in vitro*, tak *in vivo*. Množství celkových rozpustných sacharidů (sacharóza, glukóza, fruktóza) a škrobu bylo vyšší u rostlin D69 než u kontrolních rostlin. Vzhledem ke schopnosti linie D69 tuberizovat i za nízké koncentrace sacharózy v médiu, byl analyzován obsah sacharidů a zmapována jejich

distribuce po rostlině u mixotrofních a fotoautotrofních rostlin kultivovaných *in vitro* (Ševčíková et al., 2017). Fotoautotrofní rostliny vykazovaly signifikantně nižší obsah sacharidů než rostliny kultivované mixotrofním způsobem. U mixotrofních rostlin nebyl nalezen prokazatelný rozdíl v množství celkových rozpustných sacharidů u nadzemních částí rostlin D69 a kontroly. Byl však zaznamenán trend vyššího obsahu celkových rozpustných sacharidů v listech a apikálních částech rostlin D69. V bazální části stonku rostlin D69 a kontroly bylo podobné množství celkových rozpustných sacharidů. Kontrolní rostliny obsahovaly v listech a apikálních částech průkazně více škrobu než rostliny D69. Rostliny D69 měly uloženo dvakrát větší množství škrobu v bazální části stonku než v dalších orgánech, zatímco u kontrolních rostlin bylo rozložení škrobu po rostlině více méně stejné (Ševčíková et al., 2017).

Schopnost rostlin D69 tuberizovat za různých podmínek může být výsledkem nejen rozdílné distribuce a obsahu sacharidů, ale i navýšení nebo i mobility pozitivních regulátorů, případně zeslabení negativních regulátorů tuberizace (gibereliny, fotoperiodická dráha). Malý vzrůst rostlin D69 a tendence tuberizovat může značit nízký obsah giberelinů v rostlině. Pro ověření předpokladu, že rostliny D69 obsahují menší množství giberelinů, byl změřen obsah giberelinů v bazálních a apikálních částech kontrolních rostlin a rostlin D69 kultivovaných *in vitro* na médiu s 2,5 % sacharózou. Byl nalezen vyšší obsah giberelinů v rostlinách linie D69. U fotoautotrofních rostlin D69 kultivovaných *in vitro* nebyl nalezen pokles v obsahu giberelinů oproti fotoautotrofním kontrolním rostlinám. Vzhledem k výsledkům těchto experimentů nelze vyšší tendenci tuberizovat u rostlin linie D69 přičítat změněné hladině giberelinů oproti kontrolním rostlinám (Ševčíková et al., 2017).

Vzhledem k silné tendenci rostlin linie D69 tuberizovat, změněnému obsahu rozpustných sacharidů v listech a přednostní akumulaci škrobu v bazální části rostlin bylo testováno, zda jsou v listech nějaké změny v expresi genů zapojených v regulaci tuberizace. Hladina transkriptu *StSP6A* v listech byla signifikantně vyšší než u kontrolních rostlin pěstovaných *in vitro*, zatímco *StBEL5* transkript byl nižší u rostlin D69 (Ševčíková et al., 2017). Výsledky ukazují, že odlišný tuberizační potenciál lze přisuzovat nejen změněné produkci a distribuci sacharidů po rostlině, ale i posunu v produkci mobilních tuberigenních signálů.

Předkládaná práce si klade za cíl zmapovat procesy související s produkcí sacharidů v listech (fotosyntetické charakteristiky – fluorescence, obsah fotosyntetických pigmentů), stanovit obsah sacharidů v listech a míru transportu floémem (obsah sacharidů ve floémových exudátech, exprese *SUT* transportérů) a určit změny v produkci a mobilitě vybraných složek tuberizačního signálu a na základě získaných dat posoudit/odhadnout míru jejich odpovědnosti za fenotypový projev studované mutantní linie D69.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Pro provedené experimenty jsem použila rostliny lilku bramboru *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* cv. LADA (KEBR UK Praha) a z tohoto kultivaru odvozenou spontánně tuberizující mutantní linii bramboru D69 viz. Literární přehled kap. 5 (Fischer et al., 2008; Duchoslav and Fischer, 2015).

3.2. Kultivace rostlin

3.2.1. Kultivace *in vivo*

Jako výchozí materiál pro kultivaci ve skleníku jsem použila hlízy sklizené ve skleníku v předchozím období. Naklíčené hlízy jsem vysadila do květináčů se substrátem (zemina smíchaná s perlitem) a zasypala jsem je malým množstvím substrátu, případně jsem přidala malé množství hnojiva. Dalším výchozím materiálem byly rostliny napěstované v *in vitro* podmínkách (viz dále) a následně aklimatizované na podmínky *ex vitro* ve skleníku. V jednom experimentu jsem používala rostliny napěstované buď jedním, nebo druhým způsobem.

3.2.2. Kultivace *in vitro*

3.2.2.1. Kultivační médium

Jako médium pro rostliny kultivované *in vitro* jsem používala MS médium (Murashige and Skoog, 1962). Do destilované vody (dH₂O) jsem přidala odpovídající množství komerčně dodávaných solí základního MS média (Murashige and Skoog Basal Medium, Sigma-Aldrich; 4,3 g/l), dále jsem do média přidala příslušné množství roztoku vitaminů (5 ml/l), který byl připraven podle tab. 1 a uchován před použitím v 5ml centrifugačních zkumavkách v -20 °C. Další složkou média byla sacharóza (30 g/l nebo 25 g/l, případně médium neobsahovalo sacharózu, podle typu kultivace). Po důkladném rozpuštění jednotlivých složek v destilované vodě jsem za stálého míchání na míchačce upravila pH roztoku přidáním 0,2M roztoku KOH anebo 0,2M roztoku HCl na hodnotu 5,75 (pH metr Orion 410 A+). Následně jsem roztok v odměrném válci doplnila dH₂O do konečného objemu a poté jsem v roztoku rozmíchala odpovídající množství agaru (8 g/l). Médium jsem nechala za občasného míchání projít varem v mikrovlnné troubě a rozlila jsem ho po 25 nebo 50 ml do Erlenmeyerových baněk (50 nebo 100 ml). Baňky jsem uzavřela alobalem a následně nechala sterilizovat

v autoklávu (Tuttnauer 2540EK-N, po dobu 20 minut při teplotě 121 °C a tlaku 0,144 MPa).

Tabulka 1: Složení roztoku vitamínů a aminokyselin

Složka	Koncentrace látky v zásobním roztoku [g/l]	Konečná koncentrace látky v hotovém mediu [mg/l]
Inositol	20	100
Kyselina nikotinová	0,1	0,5
Pyridoxin-HCl	0,1	0,5
Thiamin-HCl	0,1	0,5
Glycin	0,4	2

Pro pěstování rostlin na mediu bez sacharózy (autotrofní kultivace) bylo třeba připravit speciální víčka umožňující dostatečnou výměnu plynů s okolím. Polypropylenový sáček jsem nastříhala na čtverce o straně asi 10 cm. Uprostřed čtverce jsem pomocí korkovrtu vyřízla dva kruhové otvory o průměru asi 10 mm. Přes vyříznuté díry jsem nalepila kruhové filtry o průměru 18 mm s velikostí pórů 0,04 μm (Sun cap closures, Sigma-Aldrich). Připravená víčka jsem umístila na Petriho misku a mezi jednotlivými víčky jsem vždy umístila filtrační papír namočený v dH_2O . Petriho misku s víčky jsem uzavřela a nechala sterilizovat v autoklávu. Pro připevnění víčka na Erlenmeyerovu baňku jsem použila gumičku, která víčko stáhla kolem hrdla baňky.

3.2.2.2. Kultivace a vegetativní množení rostlin

Veškeré manipulace se sterilními kulturami jsem vždy prováděla v laminárním boxu. Před pasážováním byly všechny nástroje vysterilizované v horkovzdušném sterilizátoru BINDER po dobu 3 hod při teplotě 150 °C. Během pasážování byly nástroje průběžně sterilizovány pomocí kahanu a 96% ethanolu.

Pro vegetativní množení a udržování kultur jsem použila nodální segmenty vyříznuté z rostlin kultivovaných *in vitro* v 50ml Erlenmeyerových baňkách. Tyto segmenty jsem po třech na baňku vysadila pomocí pinzety na nové MS médium. Udržovací kultury rostlin jsem kultivovala na mediu s koncentrací sacharózy 25 g/l (mixotrofně). Subkultivační interval byl 3-4 týdny. Rostliny kultivované pro experimenty jsem pěstovala buď mixotrofně (médium s koncentrací sacharózy 25 g/l nebo 30 g/l, baňky

překryté alobalem), nebo jsem rostliny pěstovala fotoautotrofne (médium bez sacharózy, baňky se Sun cup víčkem) v Erlenmeyerových baňkách o objemu 50 nebo 100 ml. Rostliny z udržovací kultury i rostliny pro experimenty jsem umístila do kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C a fotoperiodou 16/8 hod (světlo/tma).

3.3. Experimenty

3.3.1. Stanovení fotosyntetických charakteristik

3.3.1.1. Měření fluorescence chlorofylu a

Na intaktních rostlinách kultivovaných ve skleníku jsem vybrala vždy jeden list (třetí dospělý list od vzrostného vrcholu), který jsem zabalila na 20 min do alobalu, aby se adaptoval na tmu. Poté jsem změřila rychlou kinetiku fluorescenční indukce (OJIP test) pomocí fluorimetru FluorPen FP 100 (firma Photon Systems Instruments). Fotosystémy II rostlin adaptovaných na tmu mají plastochinony v oxidovaném stavu, změřením fluorescence slabým měřicím paprskem získáváme hodnotu F_0 , tj. minimální výtěžek fluorescence. Po vystavení rostlin saturačnímu paprsku dochází k vysycení fotochemických procesů na PSII, všechny plastochinony vázané na PSII jsou v redukované formě – dostáváme tak maximální výtěžek fluorescence (F_m). Rozdíl F_m a F_0 je označován jako maximální výtěžek variabilní fluorescence u temnotně adaptovaných rostlin (F_v). Data byla následně zpracována v excelu, kde jsem vytvořila OJIP křivku a určila variabilní fluorescenci.

3.3.1.2. Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

Obsah plastidových pigmentů (chlorofyl a, chlorofyl b, karotenoidy) jsem stanovila spektrofotometricky po extrakci barviv pomocí dimethylamidu kyseliny mravenčí (DMF). Z listů pěstovaných ve skleníku jsem odebrala korkovrtem 3 terčíky (průměr 1 cm) a umístila jsem je do skleněných lahviček se 4 ml DMF. Lahvičky s terčíky jsem uzavřela parafilmem a umístila na 7 dní do tmy v lednici (4 °C). Následně jsem změřila absorbanci na spektrofotometru Evolution 201 v programu Thermo insight. Pro měření jsem používala skleněnou kyvetu. V programu byly zaznamenávány absorbance ve vlnových délkách 480, 647, 664 a 750 nm. Obsah chlorofylů a karotenoidů (v $\mu\text{g/ml}$) byl určen pomocí rovnic popsanych v práci Wellburn (1994):

Chlorofyl a (Chl a) = $11,65 \cdot (A_{664} - A_{750}) - 2,69 \cdot (A_{647} - A_{750})$

Chlorofyl b (Chl b) = $20,81 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 4,53 \cdot (A_{664} - A_{750})$

Karotenoidy (Kar) = $(1000 \cdot A_{480} - 0,89 \cdot \text{Chl a} - 52,02 \cdot \text{Chl b}) / 245$

Následně jsem vypočítala koncentrace fotosyntetických pigmentů: chlorofylu a, b a celkových karotenoidů a poměry těchto pigmentů. Obsah fotosyntetických pigmentů jsem vztáhla na jednotku sušiny ($\mu\text{g/g}$). V experimentu jsem pro extrakci chlorofylu použila jako vstupní materiál listové terčíky. Obsah chlorofylu jsem tak mohla také vztáhnout na listovou plochu ($\mu\text{g/mm}^2$). Ve výsledcích uvádím obsah fotosyntetických pigmentů vztahený na jednotku sušiny, jelikož se od sebe výsledky významně nelišily. Dále jsem stanovila poměr Chl a / Chl b, vypovídající o stavu fotosyntetického aparátu, resp. o poměru světlosběrných antén a fotosystémů a poměr celkového chlorofylu / karotenoidům.

3.3.1.3. Stanovení obsahu antokyanů

Z rostlin kultivovaných ve skleníku jsem odebrala vzorky listů, zvážila je a vložila do mikrozkušavky. Poté jsem vzorky zmrazila v tekutém dusíku a následně nechala přibližně 20 hod lyofilizovat (Lyovac GT 2, Finn-Aqua). Poté jsem stanovila hmotnost sušiny jednotlivých vzorků. Následně jsem ke vzorkům přidala okyselený methanol (pH 1; 0,2 ml koncentrované H_2SO_4 , 9,8 ml CH_3OH), nechala jsem je zahřát v termobločku (1 min, 85 °C) a následně jsem je umístila na 48 hod do lednice (tma, 4 °C). Poté jsem vzorky centrifugovala (Eppendorf Centrifuge 5415 D; 10 min, 14 000 x g), supernatant jsem odpipetovala do čisté zkumavky a následně jsem změřila absorbanci na spektrofotometru Evolution 201 v programu Thermo insight při vlnových délkách 530 a 657 nm. Pro výpočet jsem použila vzorec upravený dle Mancinelli et al., 1975: $(A_{530} - 0,25 \cdot A_{657})$. Ve výsledném grafu je vyjádřena absorbance na jednotku sušiny vzorku (mg).

3.3.1.4. Měření rychlosti čisté fotosyntézy

Pro měření fotosyntetických charakteristik rostlin *in vivo* jsem použila infračervený analyzátor Licor 6400 (Li-COR Biosciences, Inc Nebraska, detail popisu přístroje Li-6400 - <https://www.licor.com/env/products/photosynthesis/LI-6400XT/>) vybavený listovou komorou s vnitřním světelným zdrojem. LI 6400 XT je gazometrický přístroj pro měření fotosyntézy a transpirace, který využívá principu změn koncentrace CO_2 a vodní páry v okolí měřeného listu. Světelná křivka byla stanovena při koncentraci CO_2

v okolí listu 400 $\mu\text{mol/mol}$. Ozáření pro měření rychlosti čisté fotosyntézy jsem nastavila v následujících sekvencích: 5 min, 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 10 min, 0 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 5 min, 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 5 min, 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 5 min, 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 5 min, 700 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; 5 min, 900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a 5 min, 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Interval záznamu měření byl 1 minuta. Teplotu komory jsem nastavila na 25 °C. Pro měření jsem vybrala plně vyvinutý list, který jsem vložila do listové komory tak, aby pokrýval celou její plochu. Následně jsem komoru zavřela a zahájila měření.

3.3.2. Stanovení produkce látek v listech a jejich pohybu floémem

Z látek, které se produkují v listech a pohybují floémem jsem se zabývala sacharidy a vybranými mobilními transkripty. Stanovované sacharidy v listech a ve floému pocházely vždy z jedné rostliny a to tak, že po najímání exudátů byly zpracovány použité listy. Listy pro následné stanovení množství sacharidů jsem po odebrání z experimentálních rostlin vyfotografovala a následně jsem je vložila do mikrozkuhavky a okamžitě je zmrazila pomocí tekutého dusíku a skladovala do dalšího použití při -70 °C.

3.3.2.1. Metodika jímání floémových exudátů

Jímání floémových exudátů *in vivo* a *in vitro* pro stanovení toku sacharidů

Pro jímání floémových exudátů jsem použila metodiku dle Tetyuk et al. (2013), která dosud nebyla na pracovišti zavedena. Z připravené vychlazené sterilní ultra čisté vody jsem namíchala inkubační roztok 20mM K₂EDTA (Sigma Aldrich) 1 ml/vzorek (*in vitro* pokusy) nebo 7 ml/vzorek (*in vivo* pokusy). Do Petriho misky se sterilní miliQ vodou jsem umístila řapík odříznutého listu (případně celou nadzemní část rostliny odříznutou poblíž báze stonku), a to tak, aby byla ponořena jen koncová část řapíku (stonku) a nedošlo ke smočení čepele. Potom jsem pod vodní hladinou odřízla žiletkou od řapíku 0,5 cm dlouhý segment z důvodu odstranění možných vzduchových bublin a řapík (prýt) jsem ihned přemístila do mikrozkuhavky s roztokem K₂EDTA. Přítomnost K₂EDTA v inkubačním roztoku zamezí depozici kalózy v řezem poškozených floémových elementech.

Jímání floémových exudátů *in vivo*

Jímání floémových exudátů *in vivo* včetně předpůsobení roztokem K₂EDTA probíhalo v akváriu umístěném do stinné části skleníku, zakrytém skleněnou deskou

a případně přistíněné polystyrenovou deskou. Do akvária jsem umístila technickou bavlnu politou studenou vodou a misky s ledem pro zajištění dostatečné vlhkosti vzduchu a regulaci teploty tak, aby v akváriu byla teplota srovnatelná s okolím, inkubační roztok se nevypařoval a redukovala se transpirace listů na minimum (obr. 1).

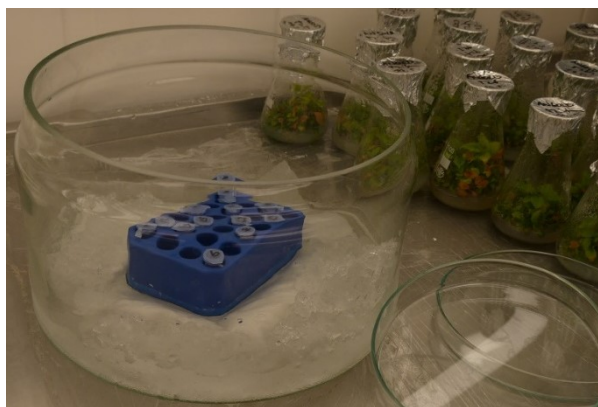


Obrázek 1: Jímání exudátů *in vivo* – skleník

Po 1hod inkubace v roztoku K_2EDTA jsem list (prýt) vyjmula, opláchla jsem řapík (stonek) v miliQ H_2O a poté ihned přemístila do kádinky se sterilní miliQ H_2O (7 ml), kde probíhalo 1 hod samotné jímání floémových exudátů. Najímaný obsah jsem přepipetovala do centrifugačních zkumavek a umístila je do $-20\text{ }^{\circ}C$ do dalšího zpracování.

Jímání floémových exudátů *in vitro*

Postup jímání floémových exudátů *in vitro* byl podobný jako u jímání floémových exudátů *in vivo*. Změny byly ve velikosti laboratorních nádob použitých pro jímání (mikrozkumavky) a v uspořádání experimentu. Jímání floémových exudátů *in vitro* jsem prováděla přímo v kultivační místnosti. Mixotrofním i fotoautotrofním rostlinám pěstovaným v kultivační místnosti (7-8 týdnů) ve 100ml Erlenmeyerových baňkách jsem pomocí pinzety a skalpelu odřízla vyvinutý list (1 nebo 2 listy) s řapíkem, nebo jsem při některých experimentech odřízla na bázi celý stonek pro jímání exudátů ze stonku a dále s nimi pracovala jako v experimentu *in vivo* (viz kap. 3.3.2.1. Jímání floémových exudátů *in vivo*). Mikrozkumavky s listy byly umístěny do velké Petriho misky (obr. 2), která nahradila akvárium použité ve skleníku. Řapíky listů byly 1 hod preinkubované v roztoku K_2EDTA . Jímání floémových exudátů probíhalo po dobu 1 hod do miliQ H_2O . Inkubační roztok i jímací roztok byl o objemu 1 ml.



Obrázek 2: Jímání exudátů *in vitro*: nádoba pro jímání v kultivační místnosti

3.3.2.2. Stanovení obsahu a spektra sacharidů v pletivech a ve floému

Stanovení plochy čepele

Po ukončení jímání exudátů jsem čepele listů odřízla a umístila jsem je spolu s pravítkem na rovné sklo, které jsem podložila filtračním papírem. Listy jsem vyfotografovala fotoaparátem Nikon umístěným na stativu. Čepele listů (*in vivo* – bez střední žilky) jsem po fotodokumentaci umístila do předem zvážených mikrozkušavek a zmrazila v tekutém dusíku a následně umístila do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, kde byly skladovány do dalšího zpracování. V programu NIS-Elements (Softwarový balík NIS-Elements, Laboratory Imaging, s. r. o.) jsem následně podle pravítka umístěného pod sklem nastavila měřítko (funkce: quick calibration). Poté jsem označila plochu listu (funkce: define threshold), pomocí nástrojů v programu jsem ručně opravila nedokonalosti, odstranila střední žilky listů a listovou plochu změřila.

Stanovení obsahu a spektra nestrukturních sacharidů

Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů – floémové exudáty

Vzorek s najímanou floémovou šťávou jsem odpařila pomocí vakuového koncentrátoru SpeedVac Plus SC110A, Savant (program V-AQ, nejprve $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, později $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ do úplného odpaření). Po odpaření jsem pelet rozpustila ve $20\text{ }\mu\text{l}$ vody a skladovala v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analýza sacharidů probíhala pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) (viz dále). Množství sacharidů ve floémové šťávě bylo vyjádřeno na listovou plochu ($\mu\text{g}/\text{hod}/\text{cm}^2$ plochy čepele listu). U vybraných vzorků jsem množství sacharidů ve floémové šťávě vztáhla na jednotku specifické listové plochy – SLA (specific leaf area: cm^2/g sušiny).

Příprava vzorků pro analýzu nestrukturních sacharidů v pletivech

Zmražené vzorky listových čepelí jsem vložila do lyofilizátoru (Lyovac GT 2, Finn-Aqua) a nechala lyofilizovat cca 20 hodin. Na analytických laboratorních vahách jsem zvážila suché hmotnosti jednotlivých vzorků. Ke každému vzorku jsem připipetovala 0,5 ml 80% metanolu a následně jsem vzorky nechala inkubovat v termobločku (Grant-Boeckel BBD) při teplotě 75 °C po dobu 10 minut. Následně byl metanol ze vzorků odpařen pomocí vakuového koncentrátoru SpeedVac Plus SC110A, Savant (3 hod, program V-AL a 45 °C). Podle suché hmotnosti vzorků jsem ke každému vzorku přidala odpovídající množství ultračisté MiliQ H₂O (tab. 2). Vzorky jsem na 15 minut umístila do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05) a následně je centrifugovala (Eppendorf Centrifuge 5415 D; 10 min, 14 000 x g). Supernatant jsem přefiltrovala pomocí injekční stříkačky přes membránový filtr (Millex Milipore, velikost pórů 0,22 µm) do nové mikrozskumavky. Přefiltrovaný supernatant byl až do analýzy uchováván při -20 °C.

Tabulka 2: Množství přidávané ultračisté vody v závislosti na hmotnosti sušiny vzorku

Suchá hmotnost vzorku [mg]	MiliQ H₂O [ml]
<5	0,2
5–10	0,3
10–20	0,5
20–30	1
30–40	1,5
40–50	2

Analýza obsahu nestrukturních sacharidů

Analýza sacharidů probíhala pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu (HPLC) s refraktometrickou detekcí s následujícími parametry: teplota kolony 80 °C; průtoková rychlost 0,5 ml/min; mobilní fáze - MiliQ H₂O; předkolonka Shodex Pb²⁺ (SP-G); kolona Shodex Pb²⁺ (SP0810); isokratická pumpa SISW HPI-300 nebo Delta Chrom SDS 030; refraktometrická detekce (detektor Shodex RI-71); software CLARITY; endogenní sacharidy byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů s příslušnými standardy (Sigma-Aldrich).

Výpočet množství jednotlivých sacharidů v pletivech probíhal podle vzorce: množství sacharidu na jednotku sušiny = $S_x / S_s * V_{H_2O} / DW$ [$\mu\text{g}/\text{mg}$]

Kde: S_x je plocha píku konkrétního sacharidu v chromatogramu konkrétního vzorku

S_s je plocha píku standardu příslušného sacharidu o známé koncentraci 1mg/ml

V_{H_2O} je objem miliQ H_2O , která byla ke vzorku přidána

D_w je suchá hmotnost vzorku

U vybraných vzorků jsem množství sacharidů vztáhla na jednotku specifické listové plochy – SLA (specific leaf area: cm^2/g sušiny).

3.3.2.3. Stanovení hladin a mobility transkriptů vybraných složek tuberigenního signálu

Detekce transkriptů v listech, stolonech a floému byla prováděna vždy z jedné rostliny a to tak, že v průběhu jímání floémových exudátů byly odebrány stolony použitých rostlin a po najímání exudátů byly zpracovány použité listy. Vzorky pro následnou izolaci RNA (čepel listu, stonek, stolon) jsem po odebrání z experimentálních rostlin zabalila do alobalu, okamžitě je zmrazila pomocí tekutého dusíku a skladovala do dalšího použití při $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Během zpracovávání vzorků odebraných pro následné stanovení hladiny vybraných transkriptů jsem při veškeré práci se vzorky používala ochranné latexové rukavice, minimalizovala čas při zpracování vzorků a využívala sterilní laboratorní sklo a komerční plastik certifikovaný pro práci s RNA, abych tak minimalizovala degradaci RNA ve vzorcích. I při izolaci RNA jak z pletiv, tak z floémového exudátu jsem postupovala tak, aby nedošlo k degradaci RNA RNázami. Používala jsem sterilní RNase-free vodu: dd H_2O s přidaným DEPC (diethylpyrokarbonát, Sigma Aldrich) o výsledné koncentraci 0,1 % se za stálého míchání inkubuje cca 15-20 hod, poté se vaří cca 4 hod, a nakonec se autoklávuje 40 min na $120\text{ }^\circ\text{C}$.

Detekce transkriptů v listech, stolonech a ve floému

Jímání floémových exudátů pro následnou detekci transkriptů

Příprava materiálu a uspořádání experimentu bylo totožné s jímáním floémových exudátů pro stanovení obsahu sacharidů v exudátech viz kap. 3.3.2.1, včetně 1h inkubace v K_2EDTA . Pro následné jímání transkriptů z floému jsem však použila speciální jímací roztok umožňující zachovat stabilitu RNA a její vyšší výtěžek. Roztok byl suplementován

směsí proteázových inhibitorů CompleteTM – EDTA-free v pracovní koncentraci 1X (Sigma Aldrich) a dále inhibitorem RNáz, Ribolockem (120U/1, 5ml jímacího roztoku, Thermo Scientific). Samotné jímání floémových exudátů probíhalo další hodinu. Ihned po najímání jsem každý najímaný roztok rozdělila na dvě poloviny a k oběma částem vzorku jsem přidala 1,5 µl LPA (lineární polyakrylamid, Sigma Aldrich), zvortexovala a přidala 0,8 ml vychlazeného izopropanolu. Následně jsem vzorky zvortexovala a umístila je do – 70 °C do dalšího zpracování (nejdříve po 48 h).

Izolace RNA z floémových exudátů, listů a stolonů

Celkovou RNA jsem jak z floémové šťávy tak i z odebraných pletiv izolovala pomocí fenol-chloroformové extrakce (Chomczynski and Sacchi, 1987) (komerčně TRIzol; Sigma-Aldrich; 1 ml TRIzolu/100 mg vzorku; k vodnému roztoku RNA z floému jsem přidávala 0,5 ml TRIzolu/vzorek).

Vzorky floémové šťávy přesrážené izopropanolem jsem nejprve zcentrifugovala (Centrifuge 5424 R Eppendorf; 40 min, 4 °C, 15 871 x g), sraženinu přesušila a následně rozpustila v 50 µl RNA-free vody a dál pokračovala izolací RNA. Ke vzorku jsem přidala TRIzol (0,5 ml TRIzol/vzorek). Následně jsem vzorek několik minut vortexovala a poté centrifugovala (Centrifuge 5424 R; 4 °C, 20 min, 15 871 x g). Horní fázi vzorku jsem přenesla do nové 1,5ml mikrozkušavky a přidala jsem 10 µl NaOAc (octan sodný, 2M, pH 4,3) a 500 µl izopropanolu. Vzorek jsem krátce vortexovala a nechala přesrážet přes noc v -20 °C. Následující den jsem vzorky centrifugovala (Centrifuge 5424 R; 4 °C, 40 min, 15 871 x g). Po vyjmutí z centrifugy jsem z mikrozkušavek odsála supernatant a pelet jsem promyla vychlazeným 75% ethanolem (1 ml) a poté opět centrifugovala (Centrifuge 5424 R; 4 °C, 15 min, 15 871 x g). Znovu jsem odsála supernatant z mikrozkušavky, pelet promyla 75% ethanolem (1 ml) a vzorek dala centrifugovat (Centrifuge 5424 R; 4 °C, 15 min, 15 871 x g). Po důkladném odsátí ethanolu jsem mikrozkušavku s otevřeným víčkem dosušila na buničité vatě na laboratorním stole a poté jsem pelet rozpustila v 25 µl vody.

Vzorky z listů a stolonů jsem po vyjmutí z -70 °C vysypala do předem vysterylizované a vymražené třecí misky, vzorek jsem zalila malým množstvím tekutého dusíku a tloučkem rozdrtila. Ke vzorku jsem přidala Trizol (1 ml/100 mg vzorku). Po důkladném rozdrcení a rozmíchání jsem vzorek pipetou přenesla do 1,5ml mikrozkušavky, vortexovala a následně jsem vzorek centrifugovala (Centrifuge 5424 R; 4 °C, 10 min, 14 674 x g). Poté jsem odebrala supernatant do nové

1,5ml mikrozkušavky. Následně jsem přidala 350 µl chloroformu a opět promíchala na vortexu. Mikrozkušavky se vzorkem a přidaným chloroformem jsem nechala 5 min stát na laboratorním stole a poté jsem vzorek opět centrifugovala (Centrifuge 5424 R, 4 °C, 20 min, 15 871 x g). Po odebrání vodné fáze jsem získanou RNA precipitovala pomocí izopropanolu, který jsem přidala ke vzorku v poměru 1:1. Po přidání izopropanolu jsem vzorek promíchala na vortexu a následně jsem vzorek na 20 min umístila na led. Poté jsem vzorek centrifugovala (Centrifuge 5424 R; 4 °C, 25 min, 15 871 x g). Supernatant jsem z mikrozkušavky odstranila opatrně pipetou, abych nenarušila pelet. Následně jsem vzorek dvakrát promyla 75% ethanolem (viz izolace RNA z floémových exudátů). Po posledním důkladném odsátí supernatantu jsem mikrozkušavku s peletem nechala dosušit na buničité vatě. Jakmile byl vzorek vysušený, pelet jsem rozpustila v 25 µl (koncentrovanější vzorky až 100 µl) RNase-free vody. Míru čistoty a koncentraci izolované RNA (z floémových exudátů i pletiv) jsem stanovila spektrofotometricky na přístroji Nanodrop (ND 1000, Thermo). Vzorek jsem dále uchovávala v -70 °C.

Elektroforetická separace pro ověření integrity RNA izolované z pletiv

Pro ověření integrity izolované RNA z pletiv jsem použila denaturační elektroforézu v Tris-acetátovém pufru 1xTAE (0,04M Tris-kyselina octová, 1mM EDTA (Masek et al., 2005)). V mém případě jsem separaci RNA prováděla v 1,5% agarozovém gelu. Příprava vzorků na elektroforézu je popsána v tab. 3. Před nanesením do jamek byly vzorky denaturovány 10 min v 65 °C a poté zchlazeny 5 min na ledu. Separace probíhala při napětí 6 V/cm.

Tabulka 3: Vzorek RNA připravený pro elektroforézu

RNA	5-15 µg
Formamid	Alespoň 50 % z výsledného objemu
Ethidium bromid (5mg/ml)	1 µl
6x LD (GelLoading Dye, Thermo Scientific)	2 µl

Dokumentaci gelu jsem prováděla pomocí Gel Logic Imagine systému (Kodak) a programu Carestream (Carestream MI Software).

Syntéza cDNA

Pro vytvoření cDNA z vyizolované rostlinné RNA jsem používala metodu reverzní transkripce, konkrétně jsem používala enzym reverzní transkriptázu

RevertAid™ M-MuLV (Thermo Scientific). Pro iniciaci syntézy jsem jako primery používala oligo(dT) a směs náhodných hexanukleotidů (RP₆). Pro inhibici RNáz jsem přidala RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific). Do 0,5ml mikrozkušavek jsem pipetovala jednotlivé složky viz tab. 4.

Tabulka 4: Složení reakční směsi 1 pro reverzní transkripci:

Celkový objem	21,4 µl
RNA (8-10 µg) + H ₂ O (RNA-free voda)	20 µl
Oligo(dT) (1µg/µl)	1 µl
RP ₆ (0,3 µg/µl)	0,4 µl

Tuto směs jsem nechala denaturovat 5 min ve vyhřátém termobločku (70 °C), zchladila na ledu (5 min), a krátce stočila ve vychlazené centrifuze. Do mikrozkušavek umístěných na ledu jsem dále přidala následující složky reakční směsi 2 viz tab. 5.

Tabulka 5: Složení reakční směsi 2 pro reverzní transkripci

Výsledný objem 40 µl	
Reakční směs 1 (tab.4)	21,4
H ₂ O (RNA-free voda)	3,6 µl
5x reakční pufr	8 µl
dNTP (10mM dNTP)	4 µl
RiboLock (40 U/µl)	1 µl
RevertAid™ (200 U/µL)	2 µl

Při optimalizaci jsem pro každý testovaný vzorek paralelně připravila negativní kontrolu (dále označovaná jako RT(-)). Pro vzorek RT(-) jsem použila všechny složky stejně jako u daného vzorku, ale vynechala jsem reverzní transkriptázu (v reakci nahrazena RNase-free vodou). Při přípravě negativní kontroly jsem se vzorky zacházela identickým způsobem jako se vzorky, které obsahovaly reverzní transkriptázu – vzorky RT(+). Hotové namíchané reakce jsem vložila do PCR cycleru (Eppendorf), nastavila a nechala proběhnout program syntézy cDNA viz tab. 6.

Tabulka 6: PCR program

HOLD	25 °C
25 °C	10 min
37 °C	5 min
42 °C	75 min
70 °C	10 min
HOLD	4 °C

Po proběhnutí reakce jsem následně skladovala syntetizovanou cDNA v -70 °C.

Kvantitativní PCR v reálném čase (real-time PCR)

Ke stanovení množství vybraných mRNA jsem použila kvantitativní PCR (qRT-PCR). LightCycler⁴⁸⁰ SYBR Green I Master jsem nechala roztát ve tmě při pokojové teplotě. Naředěnou cDNA jsem udržovala na ledu. Podle počtu plánovaných reakcí jsem si připravila příslušné objemy premixů (směsí látek). Jedna reakční směs obsahovala složky viz tab. 9. Při analýze exprese jsem využila následující transkript-specifické primery (tab. 7). Pro uskutečnění qRT-PCR reakcí jsem používala destičku LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (Roche), kterou jsem s napipetovanými vzorky vkládala do termocykleru LightCycler® 480 System (Roche). Termocykler je napojen na počítač s nainstalovaným programem LightCycler 480® Software release 1.5.0, který umožňuje analýzu relativní i absolutní kvantifikace, stanovit křivky tání, nebo např. vypočítat efektivitu amplifikace produktů. Pro zjištění efektivy qRT-PCR reakce vybraných transkriptů jsem vytvořila ředící řady (tab. 8). V rámci jedné qRT-PCR jsem detekovala transkripty sady vybraných genů (*StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StSP6A*, *StPOTH1*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4*), dále transkripty referenčních genů (tj. *polyubikvitinu* – *UBI*, *eukaryotického elongačního faktoru 1 alfa* – *eEF1α* a *G2*). Dále jsem použila primery pro kvantifikaci transkriptu kódujícího malou podjednotku Rubisco (Rubisco small chain 2C – *RbcS2*) jako kontrolu kontaminace floémových exudátů. Pro každý vzorek jsem provedla tři technická opakování. Premix pro qRT-PCR (tab. 9) jsem po 10 µl rozpipetovala do jamek destičky. Destičku jsem poté překryla fólií LightCycler480 Sealing foil (Roche). Před vložením do přístroje jsem destičku centrifugovala (2 min, 710 x g). Dále jsem vložila destičku do termocykleru a spustila jsem program pro qRT-PCR (tab. 10).

Tabulka 7: Seznam primerů pro detekci transkriptů pomocí qRT-PCR

Gen	Sekvence 5' - 3'	GI (GenBank)
<i>StBEL5</i>	<i>GCTAACAAGGAGCCAGGTGT</i>	<i>102577460</i>
<i>StBEL5</i>	<i>ATGTTTCTCTTCATTTGGAGCACT</i>	<i>102577460</i>
<i>StBEL11</i>	<i>CGCGCTTGGCTTTTCGAGC</i>	<i>102577885</i>
<i>StBEL11</i>	<i>TGGCTTCCATAGTCTAACTCTAG</i>	<i>102577885</i>
<i>StBEL29</i>	<i>CGCAGAGAGGCAAGAAATTCA</i>	<i>102577906</i>
<i>StBEL29</i>	<i>CAGCTTGCTCCAACCAAGTGTA</i>	<i>102577906</i>
<i>StPOTH1</i>	<i>AAGTCCGATCTGTCTAGGCC</i>	<i>102577616</i>
<i>StPOTH1</i>	<i>TTATCCTCACTTCTCATTGATGC</i>	<i>102577616</i>
<i>StSP6A</i>	<i>CAACTTTTACACTCTGATTATGGTG</i>	<i>102577452</i>
<i>StSP6A</i>	<i>GCTTGTATTTGTAGTTGCTGGGA</i>	<i>102577452</i>
<i>StSP5G</i>	<i>CAACCACAGGGGCAACCTTT</i>	<i>101254900</i>
<i>StSP5G</i>	<i>CGGCCCAATTGCTGGAACAA</i>	<i>101254900</i>
<i>StSUT1</i>	<i>CCATTGCCGTTTTCTGTCGTC</i>	<i>102594012</i>
<i>StSUT1</i>	<i>TTTGCTGTTCTCATCTGCCG</i>	<i>102594012</i>
<i>StSUT4</i>	<i>TCTTGGGCTTGGACAAGGCTT</i>	<i>102577516</i>
<i>StSUT4</i>	<i>GGCTGGTGAATTGCCTCCAC</i>	<i>102577516</i>
<i>RbcS2</i>	<i>CTAGCAATGGTGGAAGAGTCA</i>	<i>102600888</i>
<i>RbcS2</i>	<i>GGTACACAAATCCGTGCTCAG</i>	<i>102600888</i>
<i>G2</i>	<i>TCTTCAGAAATTTAGACTGGGAAA</i>	<i>102579728</i>
<i>G2</i>	<i>TGTCTTTGTACCTCCAATTGTC</i>	<i>102579728</i>
<i>UBI</i>	<i>CTTCAAATTTCTTTCAAGATGCAG</i>	<i>102599865</i>
<i>UBI</i>	<i>AGCCTTTGCTGATCCGGGG</i>	<i>102599865</i>
<i>eEF1α</i>	<i>GATTGCTGCTGTAACAAGATGG</i>	<i>102577640</i>
<i>eEF1α</i>	<i>GGAGATGGGGACGAATGGG</i>	<i>102577640</i>

Tabulka 8: Ředící řady

Ředění		Přiřazený počet kopií v programu LightCycler480 1.5
5x	(10 µl cDNA do 40 µl H ₂ O)	5E5
50x	(10µl 5x cDNA do 90µl H ₂ O)	5E4
500x	(10µl 50x cDNA do 90µl H ₂ O)	5E3
5 000x	(10µl 500x cDNA do 90µl H ₂ O)	5E2
50 000x	(10µl 5000x cDNA do 90µl H ₂ O)	5E1
500 000x	(10µl 50000x cDNA do 90µl H ₂ O)	5E0

Tabulka 9: Premix pro qRT-PCR (množství pro jeden vzorek)

Celkem	10 µl
2x LightCycler® ⁴⁸⁰ SYBR Green I Master (Roche)	5 µl
RNase-free voda	1 µl
Primery forward + reverse (2,5µM)	2 µl
cDNA	2 µl

Tabulka 10: Program pro qRT-PCR

Počet cyklů	Teplota a [°C]	Čas	
1x	95 °C	5 min	počáteční denaturace
45x	95 °C	10 sec	amplifikace
	59 °C	15 sec	
	72 °C	10 sec	
1x	97 °C	10 sec	křivka tání
	65 °C	1 min	
	97 °C	kontinuální	
1x	40 °C	10 sec	chlazení

Data jsem následně zpracovala v programu LightCycler 480® Software release 1.5.0. U jednotlivých amplikonů jsem stanovila křivky tání (Melt Curve Genotyping), které vypovídají o specifitě PCR produktu. Pokud jsem našla vzorky, které obsahovaly nespecifické produkty, např. diméry primerů, vyřadila jsem je z následné analýzy. Dále jsem provedla jak absolutní kvantifikaci sledovaných transkriptů, tak kvantifikaci relativní, která byla normalizována na počet kopií referenčního genu (nejčastěji polyubikvitinu). Vyhodnocení probíhalo při standartním nastavení parametrů softwaru („second derivative max quantification algorithm, mean Cps used, high confidence mode, all-to-mean pairing, standard curves in-run“). Data jsem exportovala do programu MS Excel, pomocí něhož jsem je vyjádřila graficky. Pro krabicové diagramy jsem použila hodnoty relativního počtu kopií molekul amplikonů, které jsem vztáhla na množství RNA vložené do reverzní transkripce.

Elektroforetická separace pro ověření velikosti produktů

Produkty qRT-PCR reakcí jsem ověřovala s ohledem na jejich očekávanou délku pomocí elektroforetické separace. Připravila jsem roztok 3% agarózy (w/v) v potřebném objemu 1xTAE pufru (140mM Tris-kyselina octová, 1mM EDTA). Před ztuhnutím jsem do gelu zamíchala 14 µl Ethidium bromidu (1 mg/ml). Do jamek jsem nanášela předem připravený roztok (tab. 11). Elektroforetické dělení probíhalo při napětí 5 V/cm. Dokumentaci gelu jsem prováděla pomocí Gel Logic Imagine systému (Kodak) a programu Carestream (Carestream MI Software).

Tabulka 11: Složení nanášeného vzorku

Složení nanášeného vzorku	Celkový objem 18 µl
qPCR produkt (spojeny technické replikáty)	16 µl
10x LD (Gel Loading Dye)	2 µl

3.4. Zpracování dat

Grafy a tabulky jsem vytvořila v programu Microsoft Office Excel 2016, který jsem také použila k vypočítání průměrů, směrodatných odchylek a středních chyb průměrů u jednotlivých experimentů. Data jsem statisticky vyhodnocovala v programu NCSS12 (NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA). Pro porovnání experimentálních výsledků souboru kontrolních rostlin se souborem rostlin mutantních jsem využila analýzu rozptylu jednoduchého třídění – One-Way ANOVA a v případě vzorků, které obsahovaly biologické i technické replikáty, tzv. závislá měření, jsem použila Repeated Measures Analysis of Variance (subject variable – biologický replikát, between factor variable – genotyp). Srovnání byla provedena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, $\alpha = 0,1$, případně byl ověřen trend na hladině významnosti $\alpha = 0,15$.

4. Výsledky

Experimenty byly komplexní a provedené analýzy jsem pro přehlednost shrnula v tab 12. Pro analýzy náležející k určitému experimentu byly použity stejné rostliny. Pro experimenty jsem použila rostliny kultivované ve skleníku po dobu 7-9 týdnů (IN VIVO – tab 12: jaro 2016 - LD, jaro 2017 - LD, podzim 2017- SD). V experimentu jsem využila 4-5 rostlin mutantní linie D69 a 4-5 kontrolních rostlin (Lada). Experimenty jsem rovněž prováděla s rostlinami kultivovanými *in vitro* v kultivační místnosti po dobu 7-8 týdnů. Rostliny jsem kultivovala *in vitro* jak fotoautotrofně na médiu bez sacharózy (IN VITRO F – tab 12: exp1, exp2, exp3), tak i mixotrofně na médiu s 3% sacharózou (IN VITRO M- tab 12: exp4, exp5, exp6). Rostliny kultivované *in vitro* fotoautotrofně a mixotrofně byly kultivované paralelně, a to v následující kombinaci: (exp1 + exp4); (exp2 + exp5); (exp3 + exp6). U rostlin kultivovaných *in vivo* jsem stanovila fotosyntetické charakteristiky (fluorescence chlorofylu a, rychlost čisté fotosyntézy, obsah fotosyntetických pigmentů, obsah antokyanů). Tytéž rostliny jsem následně použila pro další analýzy: stanovení obsahu RNA v pletivech, stanovení množství rozpustných sacharidů v pletivech a stanovení obsahu rozpustných sacharidů a transkriptů ve floémových exudátech. U rostlin *in vitro* jsem udělala stejné odběry a analýzy jako u rostlin kultivovaných *in vivo*, vyjma stanovování fotosyntetických charakteristik.

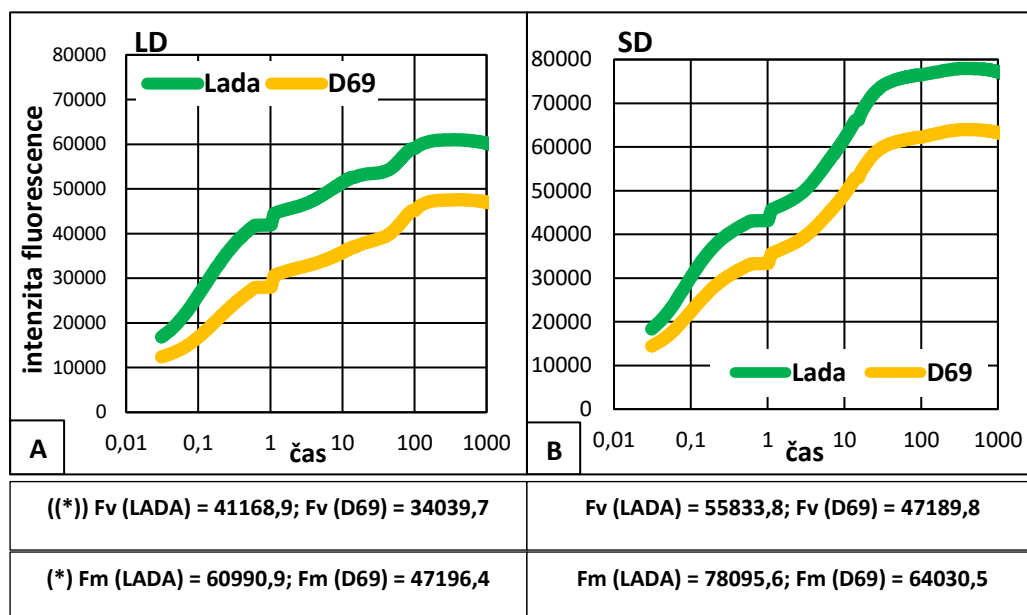
Tab 12: Souhrn provedených experimentů (odběrů a jednotlivých analýz):
Název: exp (experiment); způsob kultivace: IN VIVO, IN VITRO F (IN VITRO fotoautotrofní), IN VITRO M (IN VITRO mixotrofní)

Název experimentu	jaro 2016	jaro 2017	podzim 2017	exp 1	exp 2	exp 3	exp 4	exp 5	exp 6
Kultivace/typ analýzy	IN VIVO	IN VIVO	IN VIVO	IN VITRO F	IN VITRO F	IN VITRO F	IN VITRO M	IN VITRO M	IN VITRO M
Fluorescence chlorofylu a		✓	✓						
rychlost čisté fotosyntézy		✓							
Obsah Fotosyntetických pigmentů	✓	✓							
Obsah antokyanů		✓	✓						
Analýza sacharidů – čepel listu	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Analýza sacharidů – exudáty	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Analýza transkriptů – čepel listu	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓
Analýza transkriptů – stolon		✓							
Analýza transkriptů – exudáty		✓	✓			✓			✓

4.1. Stanovení fotosyntetických charakteristik

4.1.1. Měření fluorescence chlorofylu a

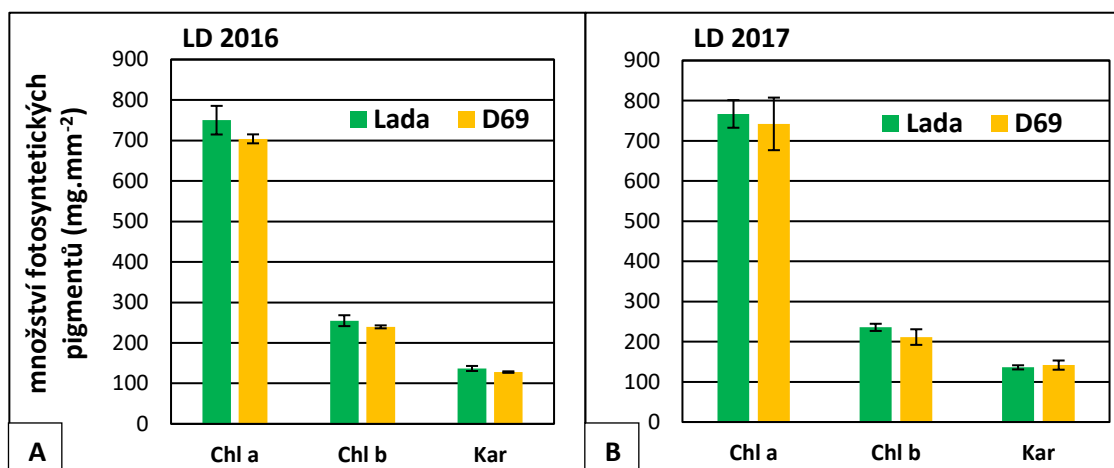
Měření fluorescence chlorofylu a jsem provedla u rostlin linie D69 a kontrolních rostlin (Lada) kultivovaných *in vivo* dvakrát: na jaře roku 2017 (graf 1A) a na podzim roku 2017 (graf 1B). Fluorescenci jsem měřila na dvou místech listu. Rostliny linie D69 vždy dosahovaly proti kontrole nižších hodnot fluorescence chlorofylu a v průběhu celé indukční křivky OJIP. Variabilní fluorescence chlorofylu a (rozdíl mezi maximální a minimální hodnotou) byla v obou experimentech nižší u mutantních rostlin D69 oproti kontrole, stejně tak hodnota maximální fluorescence chlorofylu a. I když v různých experimentech byly rostliny kultivované v odlišné sezóně, tento trend lze zaznamenat u obou měření. Zajímavé je, že u rostlin kultivovaných na podzim jsem naměřila vyšší maximální fluorescenci oproti rostlinám na jaře. Rozdíl hodnot maximální fluorescence a variabilní fluorescence mezi rostlinami D69 a kontrolou byl v experimentu provedeném na jaře 2017 statisticky průkazný na hladinách 0,1 respektive 0,15.



Graf 1: Intenzita fluorescence (OJIP křivky) u rostlin LADA a D69: rostliny kultivované *in vivo*: **A.** LD – jaro 2017, n = 5; **B.** SD – podzim 2017, n = 4; Fv - variabilní fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu vypočítaná jako rozdíl Fm (maximální výtěžek fluorescence chlorofylu) a F0 (minimální výtěžek fluorescence chlorofylu); (*) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,1$; (**) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,15$

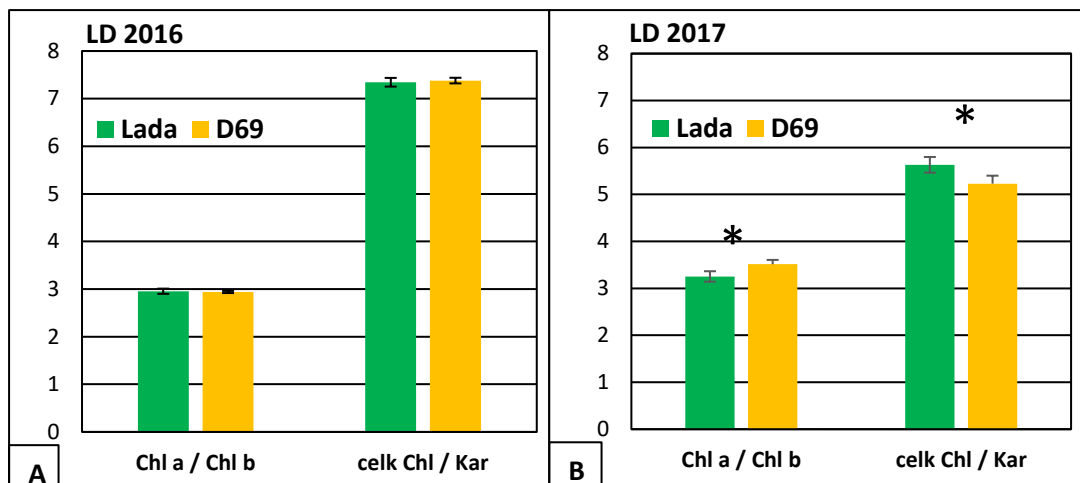
4.1.2. Stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů

První experiment stanovování množství fotosyntetických pigmentů vztažených na listovou plochu jsem prováděla na jaře roku 2016 a následně jsem experiment zopakovala o rok později. Vyhodnocená data z obou experimentů nevykazují signifikantní rozdíl mezi variantami v množství chlorofylu a, chlorofylu b ani karotenoidů (graf 2A, 2B). U výsledků obou experimentů lze zaznamenat trend mírně sníženého obsahu chlorofylu a a chlorofylu b u linií D69 oproti kontrolním rostlinám. Výsledky byly bez statisticky průkazných rozdílů.



GRAF 2: Obsah fotosyntetických pigmentů u rostlin LADA a D69: rostliny kultivované *in vivo*: obsah chlorofylu a (Chl a), chlorofylu b (Chl b) a karotenoidů (Kar); **A.** LD 2016 – jaro 2016, n = 12; **B.** LD 2017 – jaro 2017, n = 5; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru

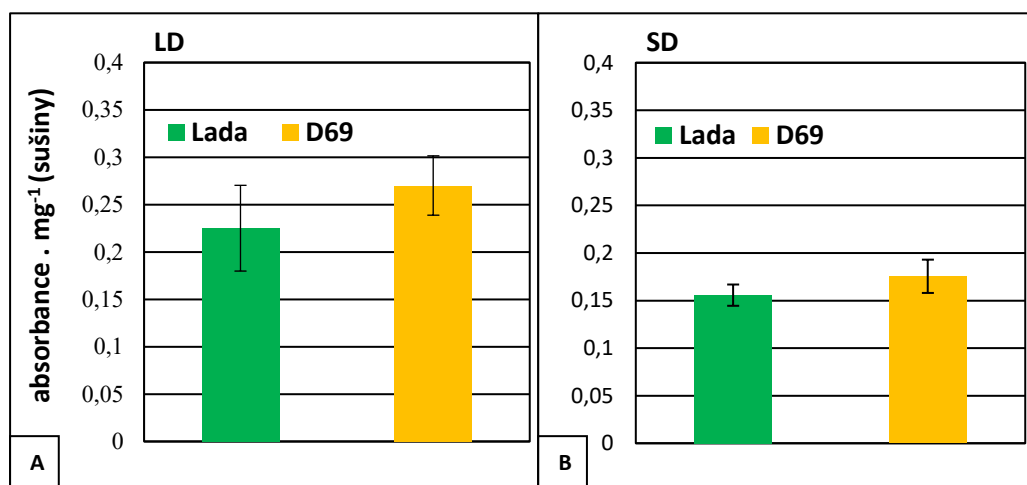
Dále jsem stanovovala poměr chlorofylu a ku chlorofylu b ($\text{Chl a} / \text{Chl b}$) a poměr celkových chlorofylů ku karotenoidům ($\text{celk Chl} / \text{Kar}$) (graf 3A, 3B). Výsledky experimentu provedeného na jaře roku 2016 byly bez statisticky průkazných rozdílů (graf 3A). Na jaře roku 2017 jsem zaznamenala vyšší hodnotu poměru $\text{Chl a} / \text{Chl b}$ u rostlin D69 oproti kontrole a tento rozdíl byl statisticky významný (graf 3B). Statisticky významný rozdíl jsem zjistila rovněž mezi poměry $\text{celk Chl} / \text{Kar}$ mezi rostlinami D69 a kontrolou (graf 3B), kdy hodnota tohoto poměru byla u rostlin D69 nižší.



GRAF 3: Poměr chlorofylu a ku chlorofylu b (Chl a / Chl b) a celkového chlorofylu a karotenoidů (celk Chl / Kar) u rostlin LADA a D69: rostliny kultivované *in vivo*: **A.** LD – jaro 2016, n = 12; **B.** LD – jaro 2017, n = 5; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; * značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$

4.1.3. Stanovení antokyanů

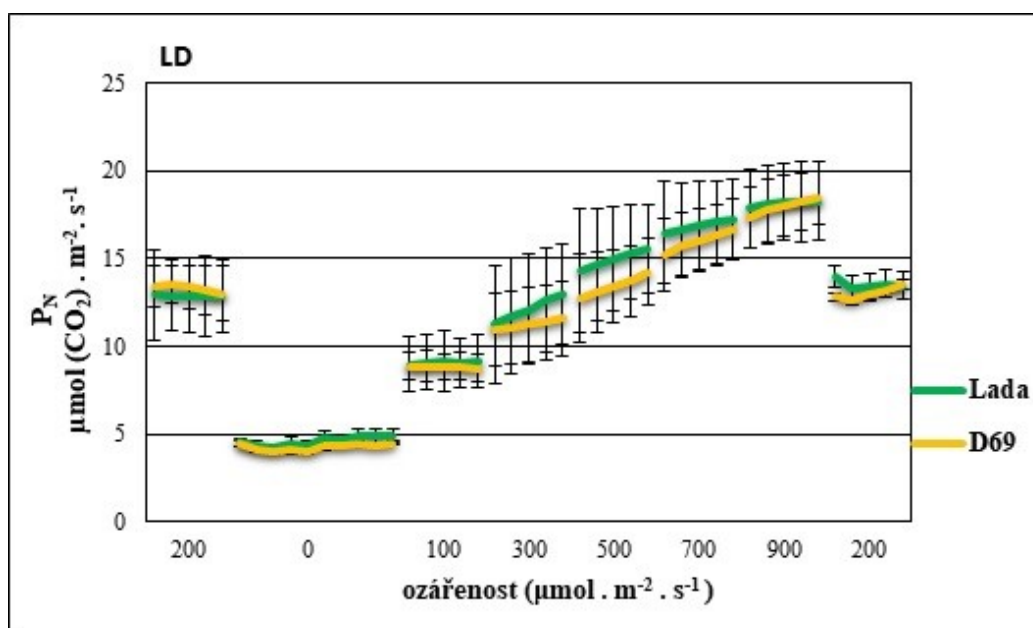
Následně jsem u rostlin pěstovaných na jaře roku 2017 *in vivo* stanovila obsah antokyanů v listech (graf 4A). Výsledky naznačují trend vyššího množství antokyanů u rostlin D69 oproti kontrolním rostlinám, rozdíl ovšem nebyl statisticky významný. Pro větší spolehlivost výsledků jsem provedla experiment znovu, a to na podzim roku 2017 s větším množstvím vzorků (graf 4B). Výsledky však pouze potvrdily trend navýšení u rostlin D69, který jsem pozorovala v předchozím experimentu provedeném na jaře (graf 4A) a rozdíl opět nebyl statisticky průkazný (graf 4B).



GRAF 4: Obsah antokyanů v listech rostlin Lada a D69: rostliny kultivované *in vivo*: **A.** LD – jaro 2017, n = 5; **B.** SD – podzim 2017, n = 15, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru

4.1.4. Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy

U rostlin kultivovaných *in vivo* jsem na jaře roku 2017 stanovila rychlost čisté fotosyntézy (P_N), kterou jsem vyjádřila množstvím asimilovaného oxidu uhličitého (CO_2) na jednotku plochy listu (m^2) za jednotku času (s). Ozáření pro měření rychlosti P_N jsem nastavila v následujících sekvencích: 5 min, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 10 min, $0 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 5 min, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 5 min, $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 5 min, $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 5 min, $700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$; 5 min, $900 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a 5 min, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Interval záznamu měření byl 1 minuta. Průměrné hodnoty rychlosti P_N za všech podmínek ozáření byly pro rostliny D69 a kontrolu srovnatelné a pohybovaly se v rozmezí 4 až $20 \mu\text{mol} \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ v závislosti na ozáření (graf 5). Při ozáření $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a při temnostní fázi nebyl nalezen rozdíl mezi hodnotami rychlosti P_N u rostlin D69 oproti kontrole. Při ozáření $300, 500, 700 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dosahovaly mutantní rostliny D69 mírně nižší rychlosti P_N v porovnání s kontrolními rostlinami, ovšem bez statisticky významných rozdílů. Při ozáření $900 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ se hodnoty rychlosti P_N mezi rostlinami D69 a kontrolou nelišily. Nenalezla jsem statisticky průkazné rozdíly mezi mutantními rostlinami D69 a kontrolními rostlinami.



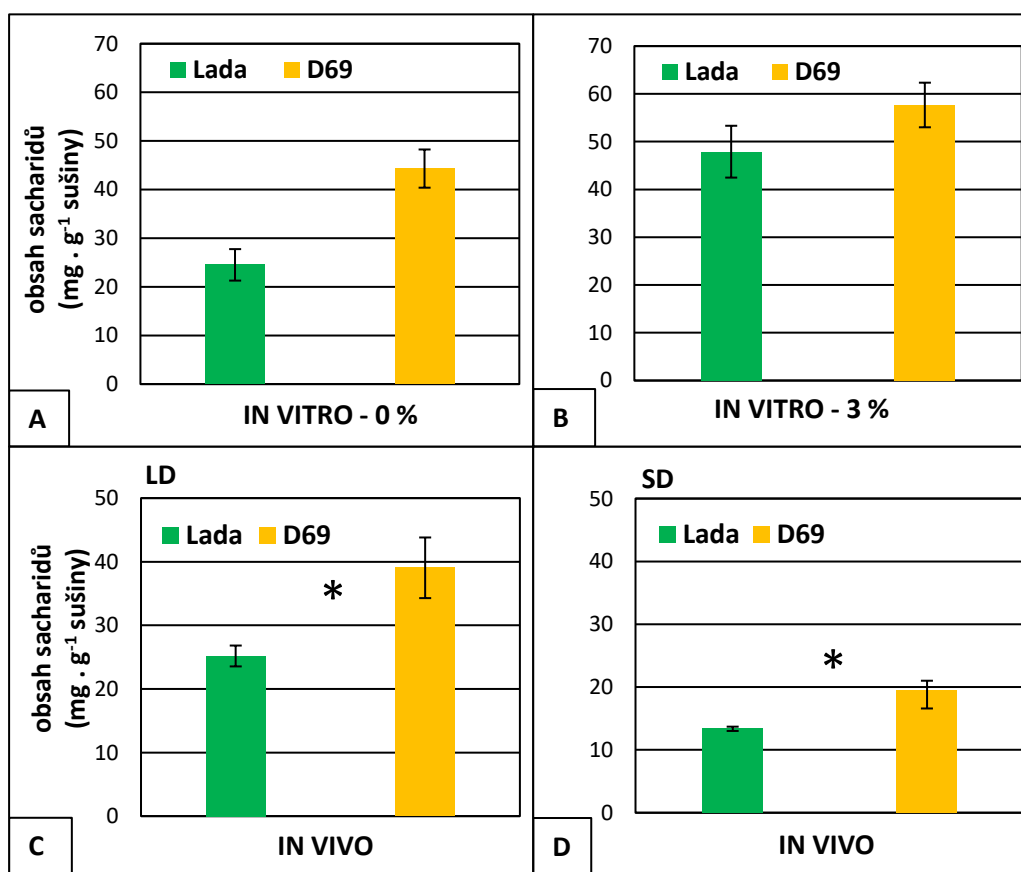
GRAF 5: Stanovení rychlosti čisté fotosyntézy u rostlin Lada a D69: rostliny kultivované *in vivo*: LD – jaro 2017, $n = 4$, za podmínek různé ozáření (0, 100, 200 ...- osa x), interval měření 1 minuta, světelná křivka byla stanovena při koncentraci CO_2 v okolí listu $400 (\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1})$, chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru

4.2. Stanovení obsahu rozpustných sacharidů v listech a ve floému

Materiál pro stanovení obsahu sacharidů v listech jsem odebírala ze stejné rostliny, ze které jsem prováděla jímání floémových exudátů. V následujících kapitolách (4.2.1., 4.2.2.) prezentuji data z vybraných experimentů. Fotoautotrofní a mixotrofní kultury *in vitro* (exp1, exp4) byly kultivovány paralelně.

4.2.1. Obsah rozpustných sacharidů v listech

Grafy ukazují výsledky analýzy sacharidů v listech rostlin kultivovaných *in vivo* na jaře (jaro 2017, graf 6C) a na podzim (podzim 2017, graf 6D), *in vitro* fotoautotrofně (exp.1: graf 6A), *in vitro* mixotrofně (exp4: graf 6B). Výsledky provedených analýz ukázaly zvýšený obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin linie D69 oproti kontrole za všech testovaných kultivačních podmínek. U většiny provedených analýz byl rozdíl mezi rostlinami D69 a kontrolou statisticky významný.

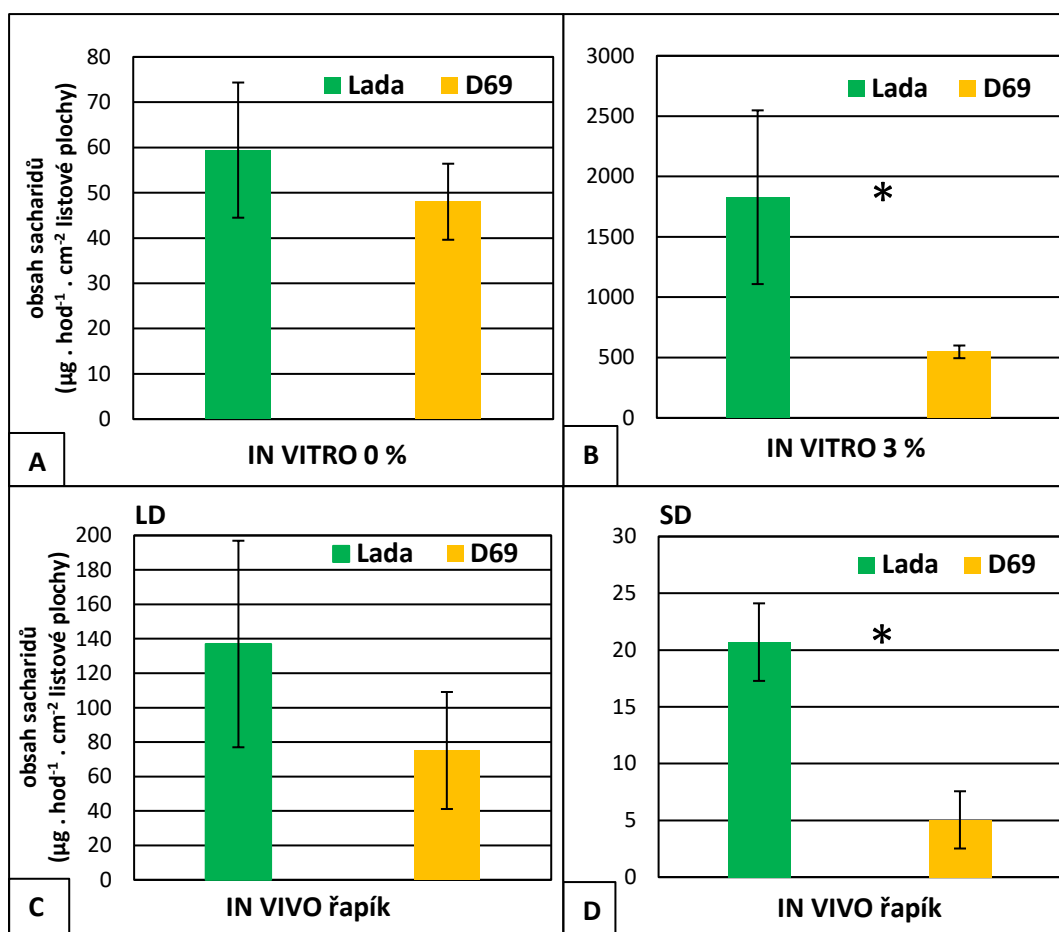


GRAF 6: Obsah rozpustných sacharidů v listech rostlin Lada a D69: A. 0% – *in vitro*, fotoautotrofní, médium bez sacharózy, n = 11-12, exp.1; B. 3% - *in vitro*, mixotrofní, médium s 3% sacharózou, n = 8; exp. 4, C. *in vivo*, n = 5, LD – jaro 2017; D. *in vivo*, n = 4, SD – podzim 2017; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; * značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$

U rostlin kultivovaných *in vitro* na médiu bez sacharózy jsem v listech zaznamenala nižší obsah sacharidů než u rostlin kultivovaných na médiu s 3% sacharózou (graf 6A, 6B). Rostliny kultivované na podzim *in vivo* měly v listech nižší obsah sacharidů než rostliny kultivované na jaře (graf 6C, 6D). Zajímavé také je, že u rostlin kultivovaných *in vitro* fotoautotrofně jsem zjistila přibližně stejný obsah sacharidů v listech, jako měly listy rostlin kultivovaných *in vivo* na jaře (6A, 6C).

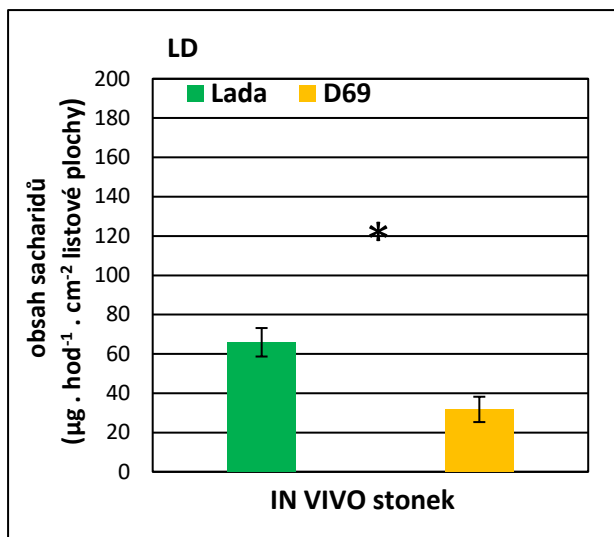
4.2.2. Obsah rozpustných sacharidů ve floémových exudátech

Po provedení analýzy obsahu rozpustných sacharidů v exudátech (z řapíku i ze stonku) jsem zjistila opačný trend, než tomu bylo u stanovení obsahu sacharidů v listech. U linie D69 oproti kontrole jsem zaznamenala trend sníženého obsahu sacharidů v exudátech bez ohledu na podmínky kultivace rostlin: *in vivo* (graf 7C, 7D, 8A), *in vitro* fotoautotrofní (graf 7A), *in vitro* mixotrofní (graf 7B). Rozdíl mezi variantami byl u některých experimentů statisticky významný. Fotoautotrofní a mixotrofní kultury *in vitro* (exp1, exp4) byly kultivovány paralelně.



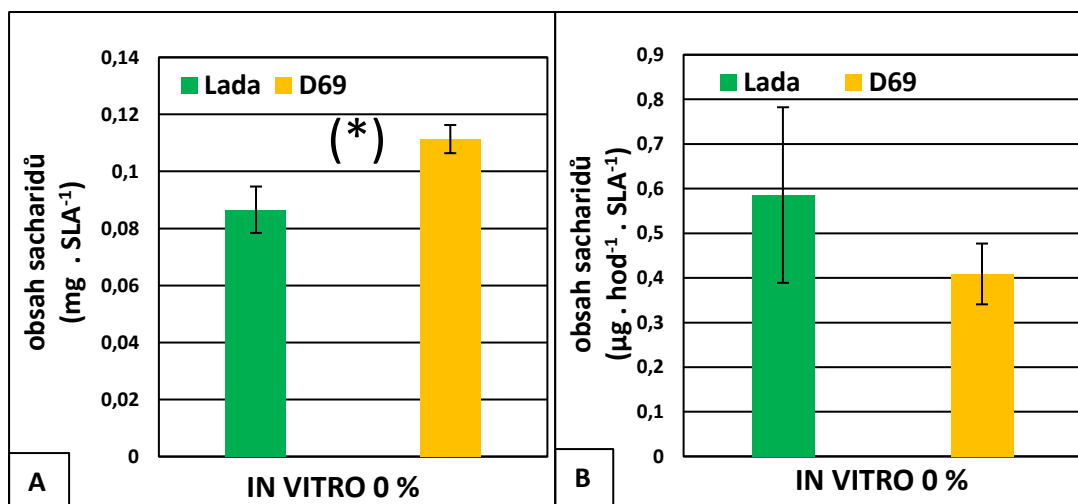
GRAF 7: Obsah sacharidů ve floémových exudátech rostlin Lada a D69: A. 0% – *in vitro*, fotoautotrofní, médium bez sacharózy, n = 4, exp.1; **B.** 3% – *in vitro* mixotrofní, médium s 3% sacharózou, n = 3–4, exp.4; **C.** *in vivo*, řapík, n = 3–4, LD – jaro 2016; **D.** *in vivo*, exudáty z řapíku, n = 3–4, SD – podzim 2017; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; * značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$

Porovnávala jsem obsah sacharidů v exudátu z řapíku (graf 7C) a stonku (graf 8) u *in vivo* kultivovaných rostlin. Najímané exudáty ze stonku rostlin D69 obsahovaly menší množství rozpustných sacharidů oproti kontrolním rostlinám. Rozdíl mezi variantami byl statisticky významný (graf 8). Po vztážení obsahu sacharidů na jednotku listové plochy jsem zaznamenala, že exudáty jímané z řapíku (graf 7C) obsahovaly přibližně dvakrát více rozpustných sacharidů než exudáty jímané ze stonku (graf 8), ale rozdíl mezi variantami u exudátů jímaných z řapíku nebyl statisticky průkazný, ačkoliv trend byl obdobný.



GRAF 8: Obsah sacharidů v exudátech rostlin Lada a D69: rostliny kultivované *in vivo*: stonek, $n = 3$, LD – jaro 2016; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; * značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$

U rostlin kultivovaných *in vitro* fotoautotrofně jsem také vyjádřila množství sacharidů v listech a v najímaných exudátech na specifickou listovou plochu (SLA- Specific leaf area) (graf 9A, 9B), abych zohlednila odlišnou mocnost listů rostlin D69 a Lada. Ačkoliv rozdíl mezi rostlinami D69 a kontrolou nebyl průkazný v listech (graf 9A), ani v exudátech (9B), trendy byly zachovány. Obsah sacharidů v listech vztažený na SLA byl stále vyšší u rostlin D69 oproti kontrole, stejně jako při vztažení obsahu sacharidů na jednotku sušiny (graf 6A). Obsah sacharidů v exudátech byl stále nižší u rostlin D69 oproti kontrole, stejně jako při vztažení obsahu sacharidů v exudátech na listovou plochu (7A).



GRAF 9: Obsah sacharidů v listech a exudátech rostlin Lada a D69 vztažený na specifickou listovou plochu (SLA): rostliny *in vitro*: 0% - fotoautotrofní, médium bez sacharózy, $n = 4$, exp.1; **A.** listy, **B.** exudáty; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; (*) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,1$

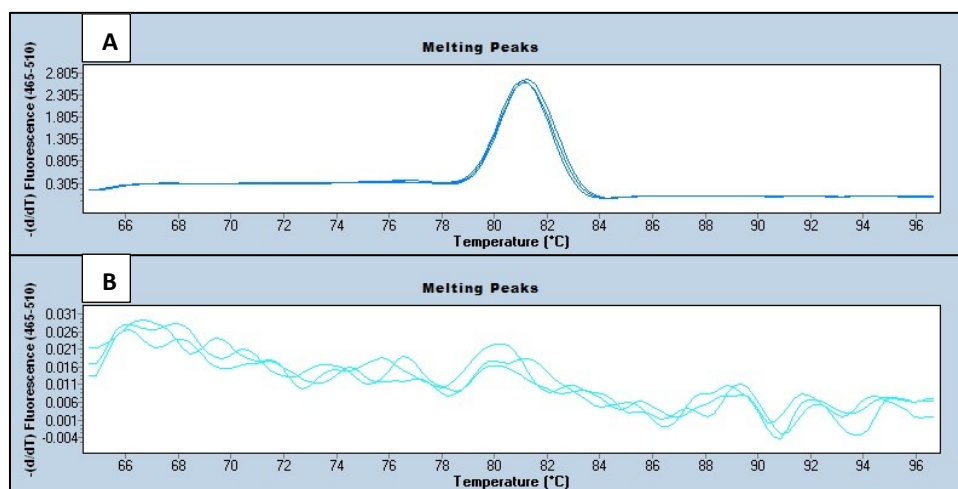
4.3. Stanovení množství vybraných mobilních transkriptů v pletivech a ve floému

Z pletiv a floému mutantních rostlin D69 a kontrolních rostlin (Lada) kultivovaných za různých podmínek (*in vivo* jaro, *in vivo* podzim, *in vitro* fotoautotrofní, *in vitro* mixotrofní) jsem izolovala celkovou RNA (odběry viz souhrnná tab. 12). Celkovou izolovanou RNA jsem reverzní transkripcí převedla do cDNA. Ze všech odebraných vzorků jsem hladinu transkriptů stanovovala u rostlin kultivovaných *in vivo* na jaře 2017 (podmínky dlouhého dne – LD) a na podzim 2017 (podmínky krátkého dne – SD). Izolovanou RNA ostatních vzorků jsem převedla do cDNA a uschovala. Z časových důvodů jsem tyto vzorky nestihla analyzovat pomocí qRT-PCR. U rostlin kultivovaných za podmínek LD i SD jsem stanovovala hladiny transkriptů v listech (v případě LD i ve stolonu) a ve floému pocházejících vždy z jedné rostliny. Relativní množství transkriptů vybraných genů (*StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4*) jsem stanovovala prostřednictvím metody qRT-PCR.

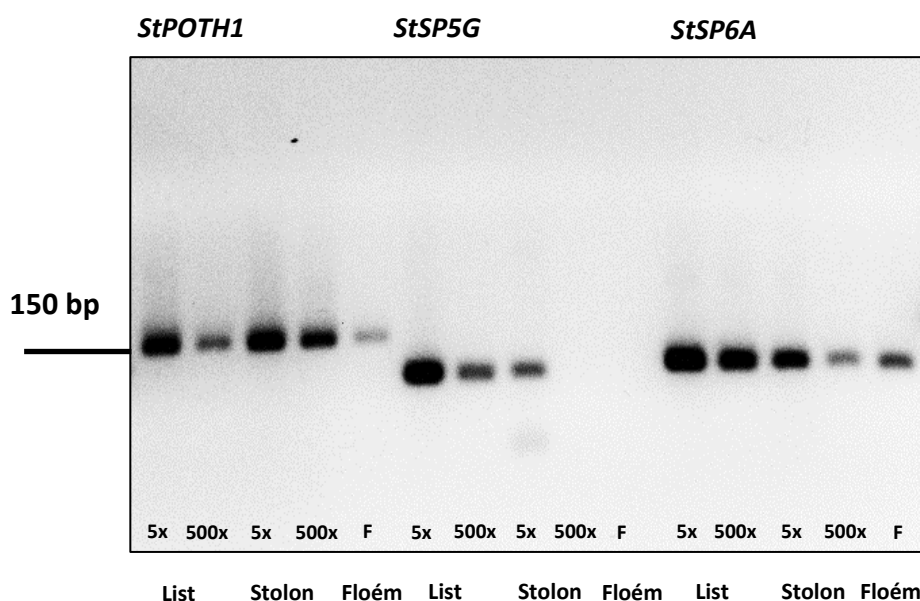
4.3.1. Navržení vhodných primerů pro qRT-PCR

Při navrhování primerů bylo cílem eliminovat případnou amplifikaci z kontaminující genomické DNA. Primery pro amplifikaci kódujících sekvencí vybraných genů jsem ve spolupráci se školitelkou navrhla tak, aby amplikon obsahoval jeden a více intronů, jeden z primerů nasedal na spojení dvou exonů, nebo kombinací obou přístupů. Tím jsem se vyhnula možné amplifikaci nespecifických produktů způsobené přítomností genomické DNA a vzorky nebylo nutné ošetřit DNázou. Přesto jsem při optimalizaci kvantitativní qRT-PCR zahrnula kontrolní reakce případné kontaminace genomickou DNA (RT-), dále jsem zhodnotila účinnost qRT-PCR reakcí pomocí zhotovení standardních křivek ředících řad templátové cDNA připravených pro jednotlivé transkripty (standardní křivky zhotovil program LightCycler® 480 SW 1.5) a zkontrolovala průběh reakcí a specifitu produktů pomocí amplifikačních křivek a křivek tání (LightCycler® 480 SW 1.5). Dále jsem velikost produktů qRT-PCR ověřila pomocí agarózové elektroforézy. Každý ze studovaných transkriptů tak prošel kontrolou kvality a specifity amplifikace. Pro představu, prezentuji pouze ukázkou křivky tání amplikonů *StSP6A* a jejich negativní kontroly RT(-) (graf 10A, graf 10B) a elektroforetogram ověřování délky vybraných produktů qRT-PCR (obr. 3). Efektivitu amplifikace produktů ředících řad templátové DNA připravených pro jednotlivé transkripty jsem vyhodnocovala vždy paralelně s testovanými vzorky v rámci jednoho experimentu

(tzn. Standard curves in-run). Pro všechny experimenty jsem používala stejnou výchozí ředící řadu templátové cDNA.



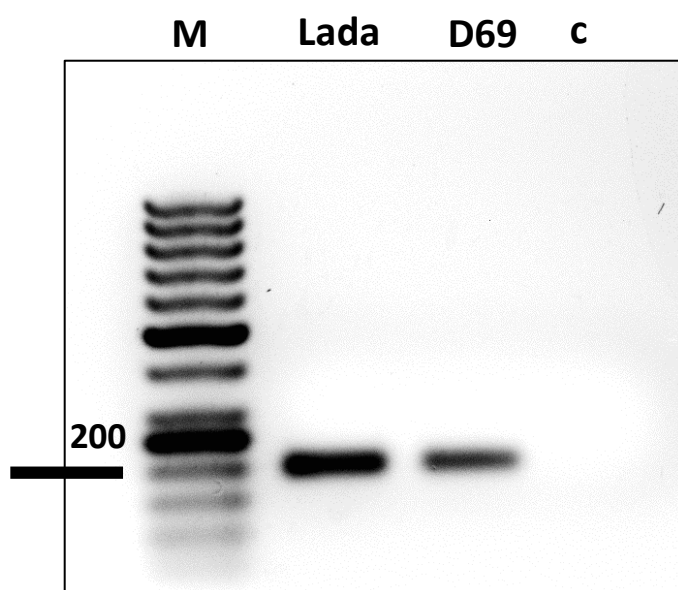
Graf 10: Analýza křivky tání amplikonu *StSP6A*: list Lada: **A.** RT+ (vzorek obsahující cDNA); **B.** (RT-) (v kroku reverzní transkripce nebyla přidána reverzní transkriptáza), navržené primery neamplifikují kontaminující genomickou DNA.



Obrázek 3: Elektroforetogram produktů qRT-PCR: testování primerů pro kvantifikaci mRNA *StPOTH1*, *StSP5G* a *StSP6A* u rostlin Lada: předpokládaná délka amplikonu *StPOTH1*: 155 bp, *StSP5G*: 106 bp, *StSP6A*: 115 bp; **fotografická dokumentace:** elektroforetické ověření produktů qRT-PCR, zleva: *StPOTH1* (list ředění cDNA 5x, list ředění cDNA 500x, stolon ředění cDNA 5x, stolon ředění cDNA 500x, Floém), *StSP5G* (list ředění 5x, list ředění 500x, stolon ředění 5x, stolon ředění 500x, Floém), *StSP6A* (list ředění 5x, list ředění 500x, stolon ředění 5x, stolon ředění 500x, Floém)

4.3.2. Optimalizace použití referenčních transkriptů

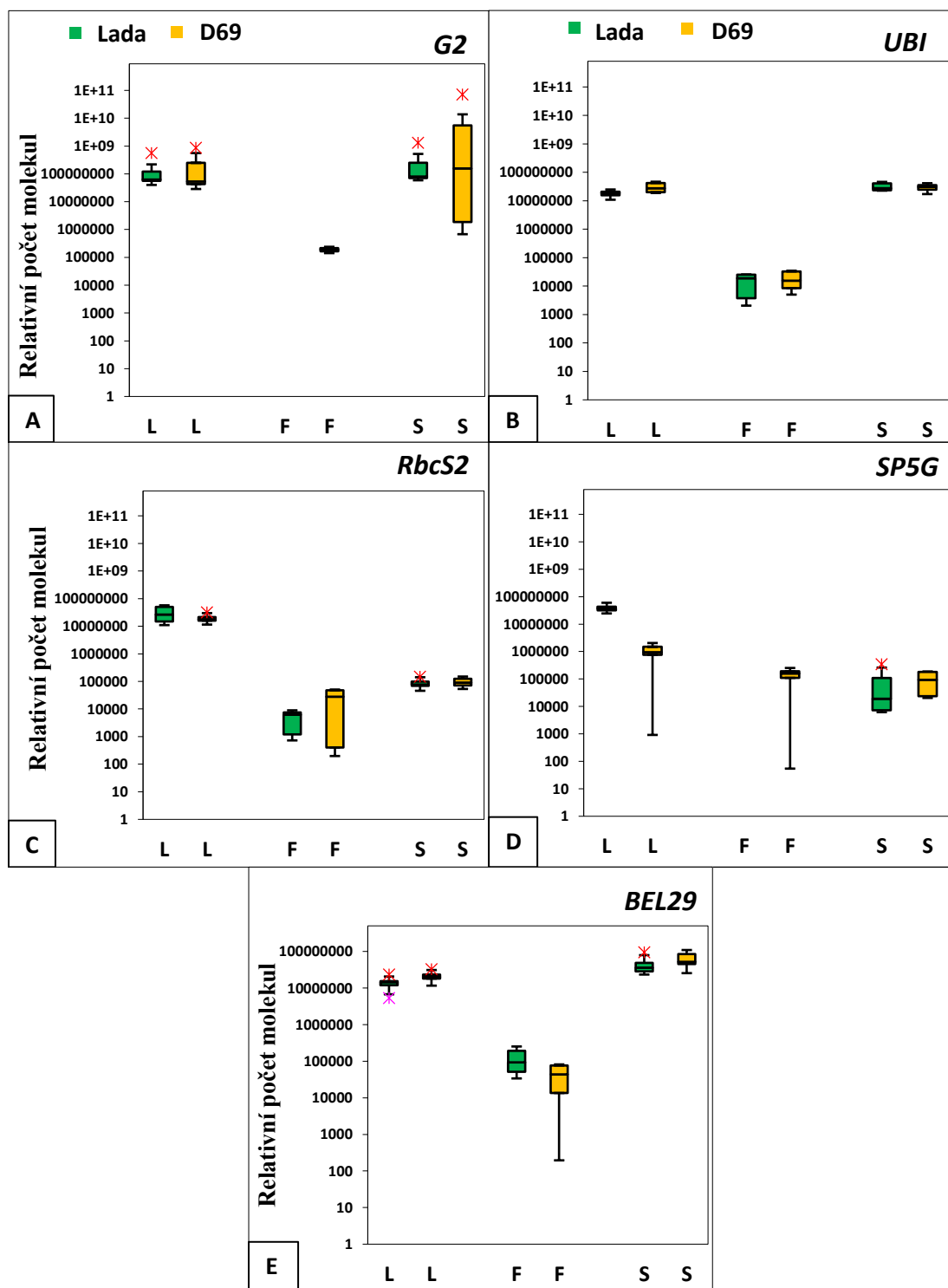
Jako referenční transkripty pro stanovení normalizované hladiny transkriptu v listech a stolonu jsem zvolila *polyubikvitin (UBI)* a *eukaryotický elongační faktor 1 alfa (eEF1a)*. Vzhledem k jejich srovnatelným hladinám při optimalizaci jsem dále používala pouze *UBI*. Pro kvantifikaci transkriptů ve floému jsem nejprve jako referenční transkript zvolila na základě literatury transkript transkripčního faktoru *G2*. Semi-kvantitativně jsem zjistila přítomnost tohoto transkriptu ve floému mutantních i kontrolních rostlin (obr. 4).



Obrázek 4: Elektroforetogram semi-kvantitativní PCR transkriptu *G2* ve floému rostlin Lada a D69: předpokládaná délka ampliconu 195 bazí; zleva: M – O’GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo scientific), Lada – *G2* ve vzorku floém Lada, D69 – *G2* ve vzorku floém D69, c – negativní kontrola, PCR reakce bez templátu

Jako negativní kontrolu, tzn. ověření, že při jímání floémových exudátů po říznutí řapíku nedošlo ke kontaminaci vzorku transkripty z okolních buněk pletiva listu, jsem zvolila transkript genu kódující malou podjednotku Rubisco – *RbcS2 (Ribulose biphosphate carboxylase small chain 2)*. Na základě výsledků qRT-PCR jsem zjistila, že transkript *G2* v mém případě není vhodné použít jako referenční transkript, protože ve floému některých kontrolních rostlin jsem tento transkript nenalezla (graf 11A). Hodnoty Ct se pro tento transkript pohybovaly v rozmezí 38 – 40, ale při další analýze se ukázalo, že se jedná o diméry primerů. Při hledání jiného vhodného kandidáta

pro normalizaci jsem se rozhodla stanovit relativní počet kopií transkriptů vybraných genů ve výchozím vzorku listu, stolonu a floému vztažený na celkové množství cDNA použité v reakci a tyto hodnoty jsem graficky znázornila (tzn. počet kopií transkriptů dle relativních ředících řad cDNA z listu, graf 11). Tento přístup samozřejmě nepostihuje případné chyby při pipetování, různou efektivitu reverzní transkripce a další faktory ovlivňující variabilitu qRT-PCR, nicméně předpokládám, že se mi podařilo postihnout celkový trend množství testovaných transkriptů při použití dostatečného počtu vzorků.



Graf 11: Relativní počet kopií transkriptu v listu, stolonu a ve floému: rostliny kultivované *in vivo*: podmínky LD, L-list, F-floém, S-stolon; **A. G2**, list, n = 18; floém, n = 0-2; stolon, n = 18; **B. UBI**, list, n = 18; floém, n = 9; stolon, n = 18; **C. RbcS2**, list, n = 18; floém, n = 9; stolon, n = 18; **D. StSP5G**, list, n = 12; floém, n = 4; stolon, n = 6; **E. StBEL29**, list, n = 18; floém, n = 9; stolon, n = 18; zleva: List Lada, List D69, Floém Lada, Floém D69, Stolon Lada, Stolon D69

Následně jsem z hodnot mediánů vzorků (pro list, floém a stolon) pro jednotlivé transkripty vypočítala poměry hodnot list/floém a stolon/floém pro každou rostlinu a poté jsem tyto poměry zprůměrovala pro rostliny D69 a kontrolní rostliny (tab. 13). Cílem bylo na základě těchto hodnot rozdělit soubor vybraných transkriptů na dvě skupiny: „mobilní transkripty“, tzn. transkripty, které jsou účelně transportovány floémem a „nemobilní transkripty“, tzn. transkripty, které se cíleně netransportují, ale nespecificky se dostávají v určité míře do floémové šťávy z průvodní buňky.

transkript	rostliny	list/floém	stolon/floém
<i>UBI</i>	Lada	2335,8	3328,4
	D69	2421,5	2378,3
<i>RbcS2</i>	Lada	10795,0	43,9
	D69	33743,7	218,7

<i>StBEL11</i>	Lada	2420,2	4150,5
	D69	358,3	5385,9
<i>StBEL29</i>	Lada	157,6	648,0
	D69	1655,5	5673,3
<i>StPOTH1</i>	Lada		
	D69	263,5	72876,0

<i>StSP6A</i>	Lada	62,7	0,1
	D69	1114,0	36,1
<i>StSP5G</i>	Lada	73037,0	41,6
	D69	14495,8	217,7

<i>StSUT1</i>	Lada	1627,4	1124,6
	D69	274,1	99,4
<i>StSUT4</i>	Lada	174,8	435,7
	D69	115,8	6784,6

Tabulka 13: Poměry mediánů hodnot relativního počtu kopií transkriptu: poměry list/floém a stolon/floém pro transkripty *UBI*, *RbcS2*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1* a *StSUT4*: Průměrné hodnoty poměrů jsou vypočítané z mediánů hodnot pro jednotlivé rostliny, podmínky LD

Hodnoty poměru mediánů list/floém transkriptů *RbcS2* a *StSP5G* byly výrazně nejvyšší, tzn. že z množství transkriptů v průvodních buňkách se do floémové šťávy dostávalo relativně málo. Na základě této úvahy jsem transkripty v souladu s literaturou vyhodnotila jako „nemobilní“. Hodnota tohoto poměru *UBI* byla rovněž vysoká, nicméně už jsem nezaznamenala tak výrazný rozdíl oproti hodnotám tohoto poměru ostatních transkriptů. Ostatní transkripty jsem více, či méně jednoznačně vyhodnotila jako „mobilní signály“, hodnoty poměru mediánů list/floém byly výrazně odlišné od *RbcS2* či *StSP5G*. Ačkoliv hodnoty poměru list/floém jednotlivých transkriptů byly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami D69 rozdílné, hodnota poměru *UBI* byla u D69 a kontroly srovnatelná. Navíc u D69 a kontroly byl rovněž medián hodnot relativního počtu kopií molekul *UBI* ve floému srovnatelný. Na základě této úvahy jsem se *UBI* rozhodla použít jako referenční transkript i při vyhodnocování normalizovaných hladin studovaných transkriptů ve floému.

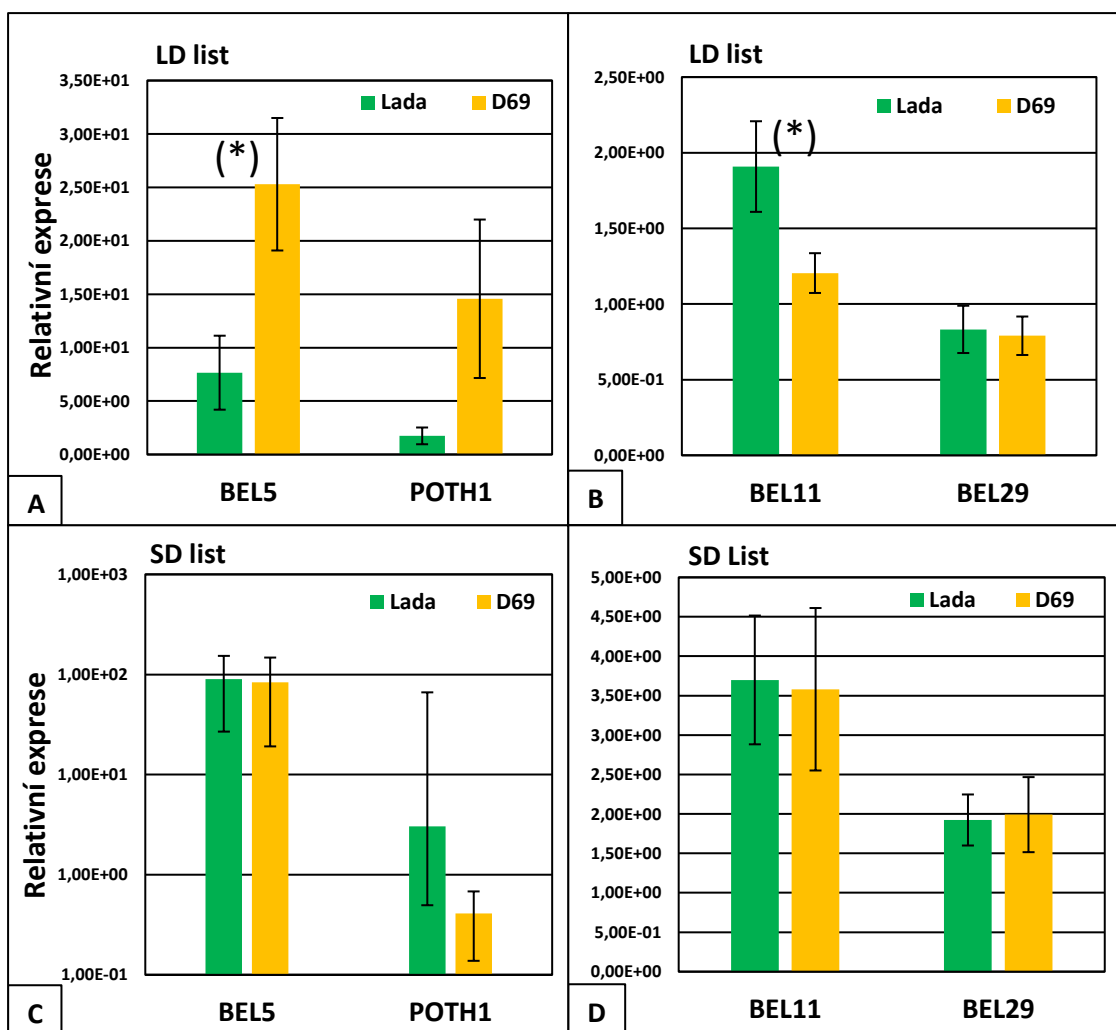
4.3.3. Vyhodnocení qRT-PCR

U rostlin D69 a kontrolních rostlin (Lada) jsem stanovovala normalizovanou hladinu transkriptů *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4*, jejíž hodnoty jsem získala analýzou různých částí rostlin kultivovaných *in vivo* za podmínek LD (jaro 2017) i SD (podzim 2017). Hladiny transkriptů jsem normalizovala na relativní množství kopií referenčního transkriptu *UBI*. Účinnost amplifikace byla u všech transkriptů maximálně do hodnoty 2,1, vyjma transkriptů *StBEL5* a *StPOTH1*, u kterých byla účinnost amplifikace kolem 2,5. Pro stanovení exprese v různých částech rostliny byla vždy použita stejná rostlina. Následně uvádím grafy znázorňující normalizované množství transkriptů za podmínek LD a SD (v listech, ve floému, příp. ve stolonu) rostlin D69 a kontroly.

4.3.3.1. Hladina transkriptů *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29* a *StPOTH1*

List

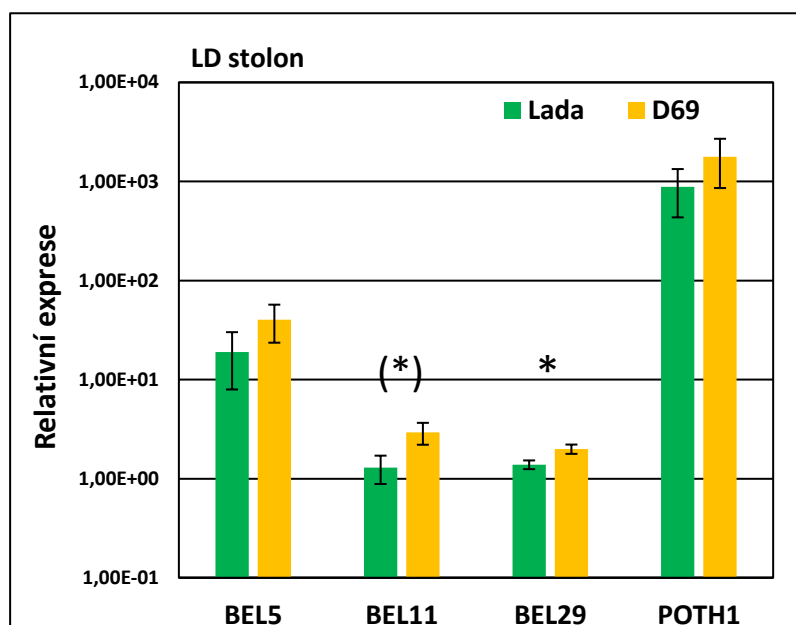
V listech rostlin D69 kultivovaných za podmínek LD jsem našla vyšší hladinu transkriptů *StBEL5* a *StPOTH1* oproti kontrole a rozdíl v případě transkriptu *StBEL5* byl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti 0,1 (graf 12A). Hladiny transkriptů *StBEL5* byly srovnatelné za podmínek SD u rostlin D69 a kontroly (graf 12C) a v listech za podmínek SD byla výrazně vyšší hladina tohoto transkriptu oproti LD u rostlin D69 i kontroly (graf 12A, 12C). Hladina transkriptů *StBEL5* v listech více či méně převyšovala hladiny ostatních transkriptů u rostlin D69 i kontroly za podmínek LD i SD. Za podmínek LD jsem zjistila nižší hladinu transkriptu *StBEL11* oproti kontrole a rozdíl byl statisticky průkazný na hladině pravděpodobnosti 0,1 (graf 12B). Za podmínek SD byla hladina transkriptu *StBEL11* u rostlin D69 srovnatelná s hladinou transkriptu u kontrolních rostlin (graf 12D), stejně tomu bylo v případě hladiny *StBEL29* za podmínek LD i SD (graf 12B, 12D). Za podmínek SD jsem zaznamenala přibližně dvojnásobné navýšení transkriptů *StBEL11* a *StBEL29* oproti podmínkám LD u rostlin D69 i kontroly (graf 12B, 12D).



GRAF 12: Hladina transkriptu *StBEL5*, *StPOTH1*, *StBEL11* a *StBEL29* v listech rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, list: **A.** *StBEL5*, *POTH1*, podmínky LD, n = 3-5; **B.** *StBEL11*, *StBEL29*, podmínky LD, n=6, **C.** *StBEL5*, *StPOTH1*, podmínky SD, n = 4; **C.** *StBEL11*, *StBEL29*, podmínky SD, n = 4-6; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; (*) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,1$

Stolon

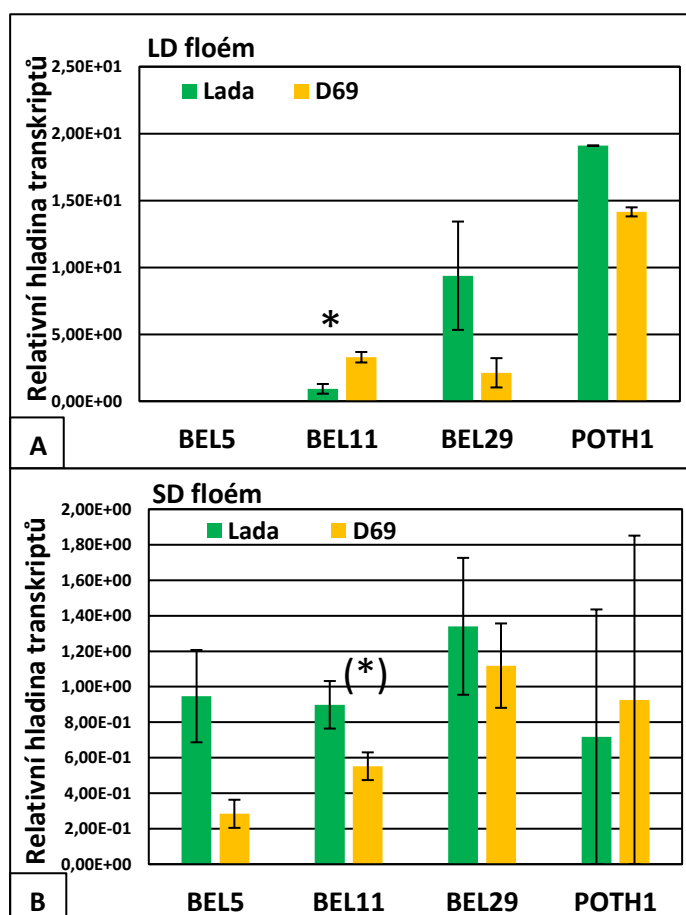
Hladiny transkriptů *StBEL5* a *StPOTH1* ve stolonu naznačovaly trend vyšší hladiny obou transkriptů u rostlin D69 oproti kontrole a hodnoty rostlin D69 i kontroly byly vyšší než hodnoty ostatních transkriptů (graf 13). Hladina transkriptů *StPOTH1* byla vyšší než *StBEL5* (graf 13). U transkriptů *StBEL11* a *StBEL29* jsem rovněž zjistila vyšší hladinu u rostlin D69 proti kontrole a tento rozdíl byl statisticky průkazný (graf 13). V případě transkriptů *StBEL5* a *StPOTH1* jsem zaznamenala výrazný nárůst hladiny ve stolonu oproti listu za podmínek LD, jak u kontroly, tak i u D69 (graf 13, 12A).



GRAF 13: Hladina transkriptu *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29* a *StPOTH1* ve stolonu rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, stolon, podmínky LD, n = 4-6; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; *značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$; (*) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,1$

Floém

Za podmínek LD se mi nepodařilo detekovat transkript *StBEL5* (graf 14A). Dále jsem zaznamenala trend, kdy za podmínek SD byla hladina transkriptů *StBEL5* u rostlin D69 nižší oproti kontrole (graf 14B). Hladina transkriptů *StPOTH1* byla za podmínek LD nižší u rostlin D69 proti kontrole (graf 14A), ale z důvodu hodnotitelnosti vzorků nešlo provést statistické vyhodnocení. Za podmínek SD byla hladina transkriptů *StPOTH1* srovnatelná u rostlin D69 i kontroly, nicméně v obou případech jsem zaznamenala velký rozptyl hodnot (graf 14B). Za podmínek LD byla hladina transkriptů *StBEL11* vyšší u rostlin D69 proti kontrole (graf 14A), zatímco za podmínek SD to bylo naopak (graf 14B). V obou případech byl rozdíl statisticky průkazný. Za podmínek LD jsem zjistila trend nižší hladiny transkriptů *StBEL29* u rostlin D69 proti kontrole (graf 14A), za podmínek SD byla hladina transkriptů *StBEL29* srovnatelná u rostlin D69 i kontroly (graf 14B).

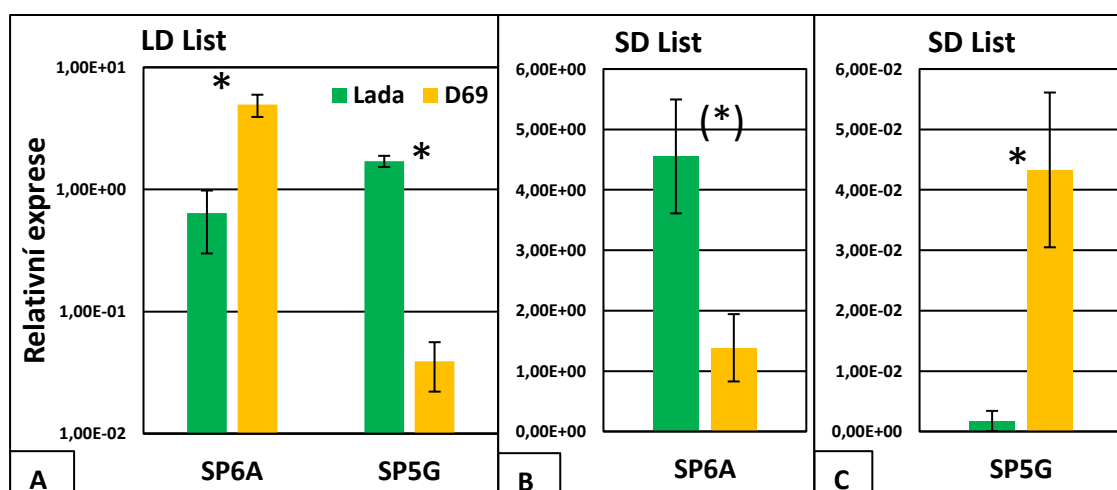


GRAF 14: Hladina transkriptu *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29* a *StPOTH1* ve floému rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, floém: **A.** podmínky LD, $n = 1-3$; **B.** podmínky SD, $n = 3$; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; * značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$; (*) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,1$

4.3.3.2. Hladina transkriptů *StSP6A* a *StSP5G*

List

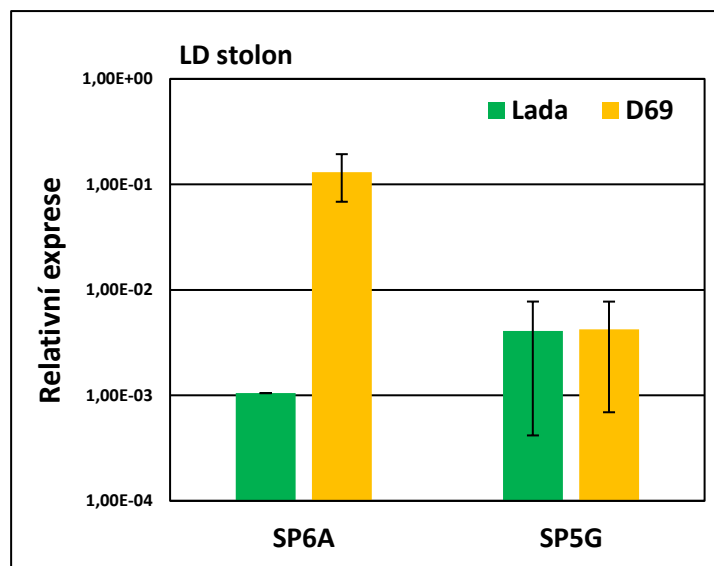
Za podmínek LD byla hladina transkriptu *StSP6A* statisticky průkazně vyšší (asi 6x) u rostlin D69 proti kontrole (graf 15A). V případě transkriptu *StSP5G* tomu bylo naopak a rozdíl (asi 40x) byl opět statisticky průkazný (graf 15A). Za podmínek SD byla hladina transkriptů *StSP6A* asi 3x nižší u rostlin D69 proti kontrole (graf 15B) a u hladiny transkriptů *StSP5G* tomu bylo naopak (20x pokles) (graf 15C). Zajímavé je, že za podmínek LD (graf 15A) byla hladina transkriptů *StSP6A* u rostlin D69 srovnatelná s hladinou transkriptů *StSP6A* u kontroly za podmínek SD (graf 15B) a hladina transkriptů *StSP6A* za podmínek SD (graf 15B) byla u rostlin D69 asi 2x větší oproti Lada za podmínek LD (graf 15A).



GRAF 15: Hladina transkriptu *StSP6A* a *StSP5G* v listech rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, list: **A.** *StSP6A*, *StSP5G*, podmínky LD, n = 4; **B.** *StSP6A*, podmínky SD, n = 6; **C.** *StSP5G*, podmínky SD, n = 2-6; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; *značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$; (*) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,1$

Stolon

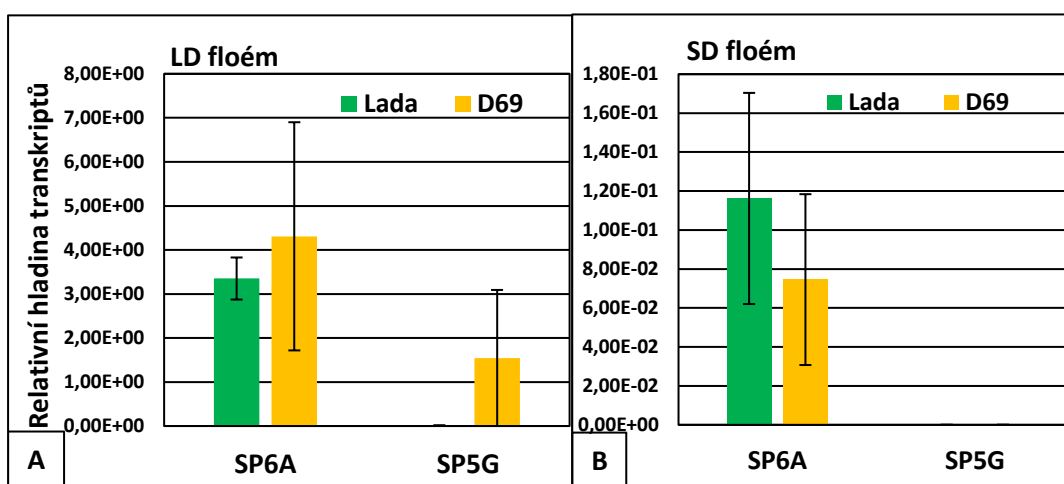
Za podmínek LD ve stolonu byly hladiny transkriptů *StSP5G* srovnatelně nízké u rostlin D69 a kontroly (graf 16). V případě transkriptů *StSP6A* jsem zaznamenala trend vyšší hladiny u rostlin D69 oproti kontrole, nicméně z důvodu špatné hodnotitelnosti vzorků nešlo provést statistické vyhodnocení (graf 16).



GRAF 16: Hladina transkriptu *StSP6A* a *StSP5G* ve stolonu rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, stolon, podmínky LD, n = 1-4; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru

Floém

Analýza transkriptů *StSP6A* ve floému za podmínek LD ukázala (graf 17A), že transkript *StSP6A* byl ve floému poměrně abundantní, jeho hladina dokonce převyšovala hladinu jiných mobilních transkriptů. Zajímavé je, že za podmínek LD (graf 17A) jsem zaznamenala vyšší hladiny tohoto transkriptu u rostlin D69 i kontroly oproti podmínkám SD (graf 17B). Transkript *SP5G* jsem detekovala pouze ve floému rostlin kultivovaných za podmínek LD (graf 17A), a to jen u některých vzorků, za SD podmínek detekovatelný nebyl (graf 17B).

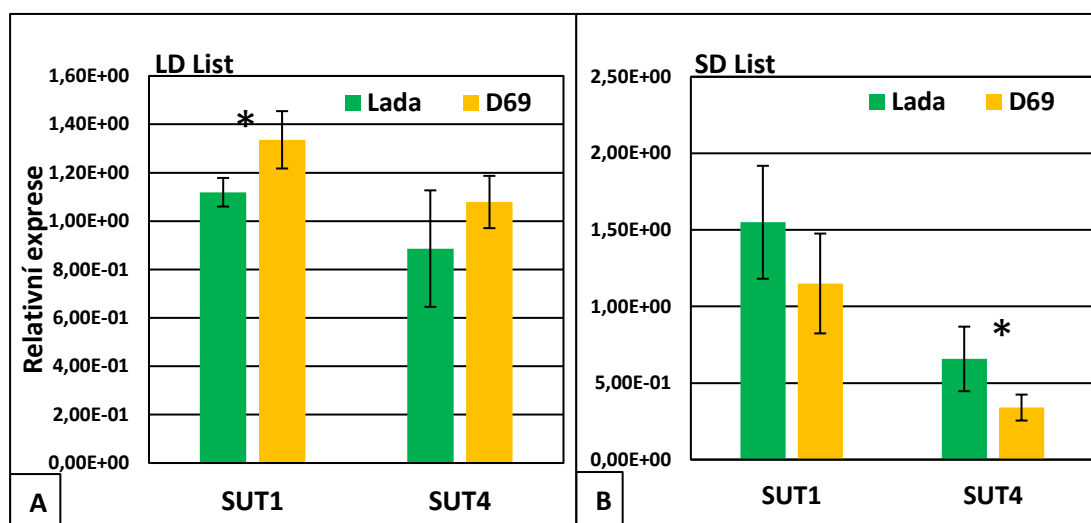


GRAF 17: Hladina transkriptu *StSP6A* a *StSP5G* ve floému rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, floém: **A.** podmínky LD, n = 1-2; **B.** podmínky SD, n = 2; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru

4.3.3.3. Hladina transkriptů *StSUT1* a *StSUT4*

List

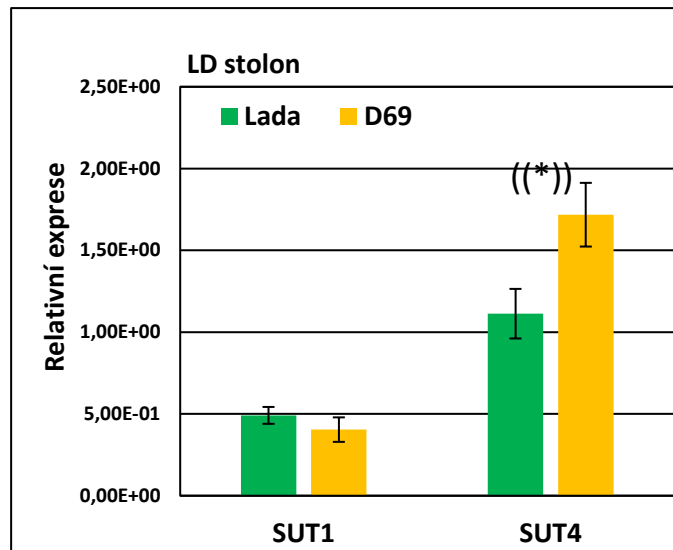
Za podmínek LD jsem v listech našla vyšší hladinu transkriptů *StSUT1* u rostlin D69 proti kontrole a rozdíl byl statisticky průkazný (graf 18A). Hladina transkriptů *StSUT4* byla u rostlin D69 srovnatelná s hladinou u kontrolních rostlin (graf 18A). Za podmínek SD byla hladina transkriptů *StSUT1* srovnatelná u rostlin D69 i kontroly (graf 18B) a hladina transkriptů *StSUT4* byla statisticky významně nižší u rostlin D69 proti kontrole (graf 18B).



GRAF 18: Hladina transkriptu *StSUT1* a *StSUT4* v listech rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, list: **A.** podmínky LD, n = 3-4; **B.** podmínky SD, n = 5-6; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; *značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,05$

Stolon

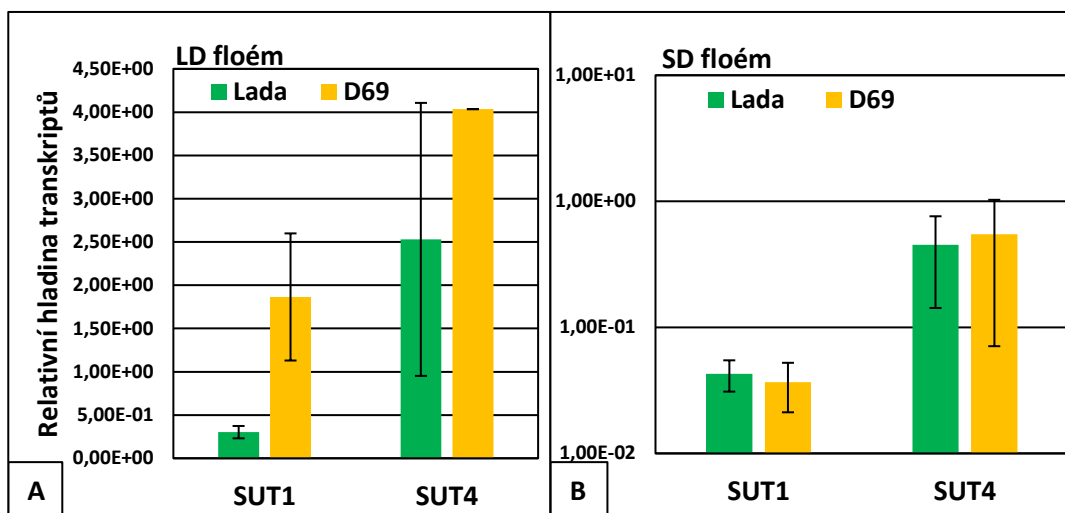
Ve stolonu jsem zjistila, že hladiny transkriptů *StSUT1* byly srovnatelné u rostlin D69 a kontroly, zatímco v případě transkriptů *StSUT4* jsem zaznamenala trend vyšší hladiny u rostlin D69 proti kontrole. Toto navýšení bylo statisticky průkazné, nicméně pouze na hladině pravděpodobnosti 0,15 (graf 19).



GRAF 19: Hladina transkriptu *StSUT1* a *StSUT4* ve stolonu rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, stolon, podmínky LD, n = 3-4; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru; (**) značí statisticky významný rozdíl na hladině $\alpha = 0,15$

Floém

Za podmínek LD jsem ve floému zaznamenala trend vyšší hladiny transkriptů *StSUT1* u rostlin D69 proti kontrole (graf 20A). Hladiny transkriptů *StSUT4* u rostlin D69 a kontroly byly srovnatelné (graf 20A), nicméně s ohledem na rozptyl dat u kontrolních rostlin a pouze jednu hodnotitelnou rostlinu D69, je možné, že rozdíly byly smazány. Za podmínek SD byla hladina transkriptů *StSUT1* srovnatelná u rostlin D69 a kontroly. V případě transkriptů *StSUT4* jsem zaznamenala velké rozptyly hodnot u rostlin D69 i kontroly, hodnoty byly víceméně srovnatelné (graf 20B).



GRAF 20: Hladina transkriptu *StSUT1* a *StSUT4* ve floému rostlin Lada a D69: rostliny *in vivo*, floém: **A.** podmínky LD, n = 1-2; **B.** podmínky SD, n = 3; normalizováno na množství kopií referenčního transkriptu *polyubikvitinu*; chybové úsečky znázorňují střední chybu průměru

Přehledný souhrn výsledků

Pro přehlednost uvádím tabulky s výslednými hodnotami pro kontrolní rostliny Lada a rostliny D69: hladiny normalizovaného množství transkriptů *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4* za podmínek LD (list, floém, stolon) a SD (list, floém) (tab. 14, 15).

Tabulka 14: Normalizované hladiny transkriptů *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4*: průměr – průměrné hodnoty normalizované hladiny transkriptů v listech, stolonech a ve floému rostlin Lada a D69, *in vivo* rostliny kultivované za podmínek LD, SE – střední chyba průměru, vnitřní standard *polyubikvitin*

transkript	LD											
	List				stolon				floém			
	Lada		D69		Lada		D69		Lada		D69	
	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE
<i>StBEL5</i>	7,66E+00	3,46E+00	2,53E+01	6,20E+00	1,90E+01	1,11E+01	4,03E+01	1,67E+01	x	x	x	x
<i>StBEL11</i>	1,91E+00	2,99E-01	1,20E+00	1,31E-01	1,29E+00	4,12E-01	2,93E+00	7,31E-01	9,27E-01	3,62E-01	3,29E+00	3,92E-01
<i>StBEL29</i>	8,32E-01	1,56E-01	7,90E-01	1,27E-01	1,39E+00	1,40E-01	1,99E+00	2,15E-01	9,38E+00	4,05E+00	2,13E+00	1,10E+00
<i>StPOTH1</i>	1,74E+00	7,85E-01	1,46E+01	7,42E+00	8,84E+02	4,50E+02	1,78E+03	9,19E+02	1,91E+01	x	1,42E+01	3,40E-01
<i>StSP6A</i>	6,39E-01	3,40E-01	4,95E+00	1,02E+00	1,05E-03	x	1,31E-01	6,25E-02	3,35E+00	4,77E-01	4,31E+00	2,59E+00
<i>StSP5G</i>	1,71E+00	1,79E-01	3,91E-02	1,70E-02	4,08E-03	3,67E-03	4,22E-03	3,52E-03	9,70E-03	x	1,55E+00	1,55E+00
<i>StSUT1</i>	1,12E+00	5,92E-02	1,34E+00	1,19E-01	4,91E-01	5,16E-02	4,04E-01	7,48E-02	3,02E-01	7,13E-02	1,86E+00	7,35E-01
<i>StSUT4</i>	8,86E-01	2,41E-01	1,08E+00	1,08E-01	1,11E+00	1,52E-01	1,72E+00	1,95E-01	2,53E+00	1,58E+00	4,04E+00	x

Tabulka 15: Normalizovaná hladina transkriptů *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4*: průměr – průměrné hodnoty normalizované hladiny transkriptů v listech a ve floému rostlin Lada a D69, *in vivo* rostliny kultivované za podmínek SD, SE – střední chyba průměru, vnitřní standard – *polyubikvitin*

transkript	SD list							
	List				floém			
	Lada		D69		Lada		D69	
	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE	průměr	SE
<i>StBEL5</i>	9,02E+01	6,33E+01	8,33E+01	6,42E+01	9,47E-01	2,60E-01	2,84E-01	7,92E-02
<i>StBEL11</i>	3,70E+00	8,17E-01	3,58E+00	1,03E+00	8,98E-01	1,34E-01	5,52E-01	7,80E-02
<i>StBEL29</i>	1,92E+00	3,24E-01	1,99E+00	4,76E-01	1,34E+00	3,86E-01	1,12E+00	2,38E-01
<i>StPOTH1</i>	3,04E+00	2,54E+00	4,10E-01	2,72E-01	7,18E-01	7,18E-01	9,26E-01	9,26E-01
<i>StSP6A</i>	4,55E+00	9,43E-01	1,39E+00	5,57E-01	1,16E-01	5,42E-02	7,46E-02	4,39E-02
<i>StSP5G</i>	1,74E-03	1,67E-03	4,33E-02	1,28E-02	x	x	x	x
<i>StSUT1</i>	1,55E+00	3,69E-01	1,15E+00	3,26E-01	4,28E-02	1,19E-02	3,68E-02	1,56E-02
<i>StSUT4</i>	6,57E-01	2,11E-01	3,40E-01	8,48E-02	4,52E-01	3,09E-01	5,49E-01	4,78E-01

Připojila jsem i tabulku pro jednodušší orientaci v odlišnostech hodnot mezi rostlinami D69 a kontrolními rostlinami (Lada) (tab. 16). Vyšší hladina transkriptů u rostlin D69 oproti kontrole je vybarvena odstíny červené barvy a nižší hladina transkriptů u rostlin D69 proti kontrole je vybarvena odstíny modré barvy. Bílá barva v tabulce značí srovnatelnou hladinu transkriptů mezi rostlinami D69 a kontrolou. Světlý odstín barvy značí rozdíl mezi rostlinami D69 a kontrolou bez statistické průkaznosti, nebo se statistickou průkazností na hladině pravděpodobnosti 0,1, příp. 0,15. Sytá barva značí výrazný rozdíl mezi rostlinami D69 a kontrolou se statistickou průkazností na hladině 0,05 (tab. 16). Šedá barva značí absenci hodnot pro daný vzorek.

	LD			SD	
	list	stolon	floém	list	floém
<i>StBEL5</i>	0,1				
<i>StBEL11</i>	0,1	0,1	0,05		0,1
<i>StBEL29</i>		0,05			
<i>StPOTH1</i>					
<i>StSP6A</i>	0,05			0,1	
<i>StSP5G</i>	0,05			0,05	
<i>StSUT1</i>	0,05				
<i>StSUT4</i>		0,15		0,05	

Tabulka 16: Souhrnná tabulka znázorňující odlišnosti hodnot hladin transkriptů *StBEL5*, *StBEL11*, *StBEL29*, *StPOTH1*, *StSP6A*, *StSP5G*, *StSUT1*, *StSUT4* rostlin D69 a kontroly (Lada) za podmínek LD (list, floém, stolon) a SD (list, floém): odstíny červené – zvýšení hladiny u rostlin D69 proti kontrole, odstíny modré – snížení hladiny rostlin D69 proti kontrole, bílá barva – srovnatelné hladiny rostlin D69 a kontroly, šedá barva – chybějící hodnoty; méně syté barvy – malý rozdíl hodnot mezi rostlinami D69 a kontrolou bez statistické průkaznosti, s průkazností na hladinách 0,1, 0,15; syté barvy – výrazný trend a rozdíl se statistickou průkazností na hladině 0,05

5. Diskuze

5.1. Mutantní linie D69

Pro diplomovou práci jsem si vybrala rostliny kultivaru Lada a z něj odvozené spontánně tuberizující mutantní linie D69. Rostliny Lada i D69 jsou na naší katedře dlouhodobě studovány, je u nich dobře zmapována řada fyziologických charakteristik, mezi nimi i tuberizační potenciál. Rostliny linie D69 kultivované *in vitro* mají na rozdíl od kontrolních rostlin kompaktnější habitus, mají kratší stonky, jejich stonky a listy jsou zbarveny tmavě zeleně až do fialova, a mají také redukovaný kořenový systém (Fischer et al., 2008). Mutantní linie D69 disponuje silnou tendencí spontánně tuberizovat za podmínek *in vitro* i *in vivo*. Dosud jedinou stálou změnou detekovanou u mutantní linie D69 je ztráta jedné izoformy mangan-stabilizujícího proteinu MSP (PsbO1), který je součástí fotosystému II. Izoforma proteinu MSP chyběla v listech rostlin D69 za všech testovaných podmínek (Fischer et al., 2008). Lze předpokládat, že nepřítomnost alely *PsbO1* nějakým způsobem ovlivňuje procesy primární fáze fotosyntézy, tedy účinnost fotosyntézy, a tím i metabolismus sacharidů. Nezávisle na předchozích experimentech Fischera et al. (2008), Gururani et al. (2012) transformovali rostliny bramboru tak, že získali transgenní linie se zvýšenou i sníženou expresí genu *MSP* (není zřejmé, které izoformy genu *MSP*). Rostliny, které měly sníženou expresi genu *MSP* vykazovaly rychlejší iniciaci tuberizace a větší výnosy. Z toho lze tedy usuzovat, že zásah do komplexu, který je součástí fotosystému II (tedy zásah do primární fáze fotosyntézy), je nějakým způsobem propojený s časnějším nástupem tuberizace. Cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda je za fenotyp mutantní linie D69 zodpovědná změněná produkce a tok asimilátů po rostlině a s tímto tokem spojený transport vybraných mobilních transkriptů a pokud ano, tak do jaké míry.

5.2. Fotosyntetické charakteristiky rostlin D69 a Lada

Nejprve jsem se u mutantních rostlin D69 a kontrolních rostlin Lada kultivovaných ve skleníku zaměřila na stanovení fotosyntetických charakteristik (fluorescence chlorofylu a, rychlosti čisté fotosyntézy, obsahu fotosyntetických pigmentů a antokyanů).

Z výsledků článku Ševčíková et al. (2017) je zřejmé, že kvantový výtěžek fluorescence chlorofylu a je u mutantních rostlin D69 signifikantně nižší oproti rostlinám Lada. K podobným výsledkům dospěli i Gururani et al. (2012), kteří stanovovali fluorescenci chlorofylu a u transgenních linií rostlin se sníženou expresí genu *MSP*.

Tyto výsledky korespondují s výsledky, které jsem získala ze svých experimentů (graf 1A, 1B). U všech opakování experimentu byl trend nižší variabilní fluorescence chlorofylu a u rostlin D69 oproti Lada a křivka OJIP měla vždy ve všech fázích nižší hodnoty u rostlin D69 oproti rostlinám Lada. Tato data společně naznačují zasažení reakcí primární fáze fotosyntézy. U rostlin, u kterých jsem změřila fluorescenci chlorofylu a jsem tedy následně změřila i rychlost čisté fotosyntézy. Nicméně rychlosti čisté fotosyntézy rostlin D69 a rostlin Lada nevykazovaly téměř žádný rozdíl, a to nezávisle na hladině ozáření (graf 5). Zdá se tedy, že rostliny dokázaly celkem zdařile kompenzovat pokles efektivity primární fáze fotosyntézy, takže se nakonec v celkové rychlosti fotosyntézy výrazně neprojevil. Pro ověření výsledků by však bylo vhodné experiment zopakovat, nicméně z důvodu poruchy měřicího přístroje Li-cor se to již nepodařilo.

Dále jsem se rozhodla u rostlin *in vivo* stanovit obsah fotosyntetických pigmentů a antokyanů. Vzhledem k odlišnému zbarvení mutantních rostlin D69 jsem usuzovala na změněný obsah pigmentů proti rostlinám Lada. Ve výsledcích své dizertační práce Fischer (2005) uvádí, že zjistil u 2týdenních rostlin D69 kultivovaných mixotrofně *in vitro* statisticky významně nižší obsah chlorofylu a, chlorofylu b a karotenoidů oproti rostlinám Lada. Naproti tomu Ševčíková et al. (2017) zjistili u rostlin kultivovaných *in vitro* po dobu 5-6 týdnů signifikantně vyšší množství chlorofylu a, karotenoidů, i signifikantně vyšší množství celkového chlorofylu u rostlin D69 oproti rostlinám Lada. Ovšem v tomto případě byly rostliny kultivovány *in vitro* fotoautotrofně. Dále Fischer (2005) uvádí, že rostliny D69 a Lada kultivované *in vivo* se obsahem fotosyntetických pigmentů významně nelišily, s čímž jsou mé výsledky ve shodě. U mnou kultivovaných rostlin D69 *in vivo* nebyl výrazný rozdíl v množství chlorofylu a, chlorofylu b, karotenoidů oproti rostlinám Lada (graf 2A, 2B). Avšak při stanovení poměru Chl a / Chl b jsem zjistila vyšší hodnotu poměru u rostlin D69 proti rostlinám Lada (graf 3B), což může indikovat snížení počtu světlosběrných antén oproti reakčnímu centru fotosystému II (Lichtenthaler and Buschmann, 2001). Ve stejném experimentu jsem zaznamenala nižší hodnotu poměru celkového chlorofylu ku karotenoidům u rostlin linie D69 oproti Lada (graf 3B). Nižší hodnoty tohoto poměru mohou znamenat senescenci, stres a poškození fotosyntetického aparátu rostlin (Lichtenthaler and Buschmann, 2001). To je ve shodě s makroskopickým pozorováním listů, kdy u rostlin D69 jsem zaznamenala tendence ztráty pigmentů na okraji listu a zdá se také, že rostliny celkově rychleji vstupují do fáze senescence.

Dále u mnou kultivovaných rostlin *in vivo* ve všech opakováních experimentu měly rostliny D69 zachovaný trend zvýšeného množství antokyanů v listech (graf 4A, 4B). Gururani et al. (2013) zjistili u rostlin se sníženou expresí *MSP* oproti kontrolním rostlinám značnou stresovou toleranci při vystavení abiotickým stresům. Zjistili mj. zvýšený obsah antioxidantních enzymů a prolinu při vystavení transgenní rostliny abiotickému stresu a zvýšený obsah askorbátu při vystavení stresu i v běžných podmínkách. S těmito výsledky se zvýšený obsah antokyanů v listech rostlin D69 zdá být ve shodě, protože antokyany mají také antioxidantní vlastnosti.

5.3. Obsah sacharidů v listech a ve floému rostlin

Fischer a kol (2008) porovnávali obsah sacharidů v listech a stoncích rostlin D69 a rostlin Lada. U listů rostlin kultivovaných *in vitro* na médiu s 3% sacharózou byl celkový obsah sacharidů a škrobu u rostlin D69 vyšší oproti rostlinám Lada. Stejně výsledky byly dosaženy u rostlin kultivovaných ve skleníku (Fischer et al., 2008). Výsledky Ševčíková et al. (2017) rovněž ukazují trend vyšší hladiny rozpustných sacharidů v listech rostlin D69 oproti rostlinám Lada. Po stanovení obsahu sacharidů v listech mnou kultivovaných rostlin jsem zjistila, že předchozí výsledky jsou s mými výsledky ve shodě (graf 6A, B, C, D). Stanovení obsahu sacharidů v listech jsem musela zopakovat, protože jsem tuto hodnotu používala při stanovování dalších charakteristik a rovněž jsem to považovala za důležité, protože je obecně známo, že již malá změna kultivačních podmínek může vést k signifikantním změnám sacharidové bilance. U mutantních rostlin kultivovaných *in vivo* i *in vitro* (fotoautotrofně i mixotrofně) jsem naměřila signifikantně vyšší množství rozpustných sacharidů vztažených na jednotku sušiny proti rostlinám Lada (graf 6A, B, C, D). I když při některých opakováních nebyl rozdíl mezi variantami významný, byl vždy zachován trend vyššího množství sacharidů v listech rostlin D69. Mutantní rostliny D69 mají tedy podle zmíněných experimentů více či méně zvýšenou hladinu celkových sacharidů v listech, a to jak v případě vztažení na jednotku sušiny, tak na specifickou listovou plochu (graf 9A). Nabízí se hypotéza, že existuje zvýšený potenciál pro transport produkovaných sacharidů z listů floémem do stolonu, kde dochází k iniciaci tuberizace, a že zvýšený transport může být alespoň zčásti zodpovědný za fenotyp rostlin D69. Na základě této hypotézy, jsem se snažila zmapovat, kolik je z listů exportováno sacharidů.

Časově náročnou fází mé práce byla optimalizace metodiky jímání floémových exudátů z rostlin kultivovaných jak *in vivo*, tak *in vitro*, ta dosud nebyla v naší laboratoři zavedena. Na floém se v současné době pohlíží jako na „informační superdálnici“,

kteřá hraje důležitou roli nejen v transportu asimilátů a živin, ale i v reakcích na abiotický a biotický stres a koordinaci růstu a vývoje rostliny (přehledně např. v Lough and Lucas 2006). Překážkou při získávání floémových exudátů je schopnost floému se po poranění uzavřít. Způsobů, jak získat floémové exudáty rostliny, je několik, např. u tykvovitých lze získat floémové exudáty říznutím řapíku, kdy nejdříve se odstraní první kapka kontaminovaná poškozenými buňkami a následně je možné odebírat relativně čistý obsah floému. Dalším možným způsobem je stylektomie pomocí mšic, kdy se mšice přisají styletem do sítkových elementů a následně se mšice odstraní pomocí laseru a exudáty jsou jímány ze zbylého styletu. Nicméně proteiny, které se dostanou se slinami mšic do floému mohou způsobit změnu kompozice floému (Tetyuk et al., 2013). Metodou používanou k získání informací o expresním profilu průvodních buněk floému je také laserová mikrodisekce (přehledně např. v Nelson et al. 2006).

Dalším možným způsobem, jak získat floémové exudáty, který jsem použila, je jímání floémových exudátů předpůsobením K₂EDTA (po dobu 1-2 h). Roztok EDTA zabraňuje uzavření floému, vychytává Ca²⁺ ionty, které by se procesu uzavření floému účastnily (King and Zeevaart, 1974). Jímání floémových exudátů musí probíhat v dostatečné vlhkosti vzduchu, aby se předešlo ztrátám transpirací. Pro usnadnění následné analýzy a eliminaci negativního působení EDTA na buněčné struktury a stabilitu exudátů může probíhat samotné jímání exudátů do ultračisté vody (Tetyuk et al., 2013). Postup jímání floémových exudátů bylo nutné optimalizovat a modifikovat tak, aby byl použitelný pro *in vivo* i *in vitro* pokusy a dále mohlo být získáno co nejvíce informací o dané rostlině. Optimalizace spočívala např. ve zvolení vhodného prostředí a nádob pro jímání, způsobu zastínění a zajištění co možná nejnižších ztrát exudátů způsobených transpirací. Dále jsem např. optimalizovala způsob měření listové plochy, kdy se prvotně zvolená metoda skenování listů ukázala málo šetrnou zejména s ohledem na zachování obsahu a spektra sacharidů. Proto jsem zvolila fotografování listů pomocí fotoaparátu umístěném na stativu ihned po odběru.

Výsledky experimentů překvapivě ukázaly opakující se jev, kdy floémové exudáty mutantních rostlin obsahovaly menší množství celkových rozpustných sacharidů oproti exudátům kontrolních rostlin Lada (graf 7A, B, C, D). Ačkoliv rozdíl nebyl vždy statisticky významný, tento trend se vyskytoval u všech opakování experimentu, za podmínek kultivace *in vivo*, *in vitro* fotoautotrofně i mixotrofně. Pro následnou analýzu sacharidů jsem jímala floémové exudáty ze stonku i z řapíku rostlin.

Zatímco transport floémem z řapíku může probíhat jak směrem nahoru ke SAM, tak směrem dolů do stolonu a ke kořenům, při jímání z na bázi uříznutého stonku jsem jímala sacharidy určené pro stonek a kořeny. Výsledný trend získaný z jímání ze stonku (graf 8) byl shodný s trendem získaným při jímání floémových exudátů z řapíku (graf 7C). Vzhledem k tomu, že jsem u rostlin *in vivo* v exudátech najímaných ze stonků zjistila nižší množství sacharidů vztažených na jednotku listové plochy než v exudátech najímaných z řapíku a že optimalizace metodiky jímání exudátů ze stonku se ukázala technicky a časově náročnou, rozhodla jsem se dále používat pouze metodu jímání floémových exudátů z řapíku listu. Z důvodu náročnosti provedení experimentu a kladení důrazu na pokus o srovnatelné podmínky mezi jedinci, jsem vždy jímala exudát najednou pouze z 8-10 rostlin. Vyšší počet rostlin v experimentu by byl na úkor kvality provedení jímání. Nízký počet rostlin, a tedy i nízký počet vzorků byl problematický v případě, že se některý vzorek nepodařilo správně najímat, nebo zpracovat. I přesto se zdá být výsledek dostatečně přesvědčivý. Jak jsem již zmiňovala, listy rostlin D69 jsou kompaktnější než listy rostlin Lada, proto jsem u vybraného experimentu vztáhla množství najímaných sacharidů v exudátech jak na jednotku listové plochy, tak i na specifickou listovou plochu (graf 9B). Nicméně trend nižšího množství sacharidů v exudátech rostlin D69 byl zachován (optimální by bylo použít vztažení na jednotku SLA ve všech experimentech, nicméně u některých experimentů chyběla potřebná data). Abych použila vztažení na stejný parametr, vztáhla jsem obsah sacharidů v listech rovněž na specifickou listovou plochu (graf 9A). Trend vyššího množství sacharidů v listech rostlin D69 byl rovněž zachován. Na základě získaných výsledků lze usuzovat, že u rostlin D69 není výrazně zvýšen transport sacharidů floémem z listů oproti rostlinám Lada, trend je jasně opačný. U rostlin D69 zřejmě došlo k narušení vztahů v rámci hospodaření rostliny se sacharidy. Narušení procesů primární fáze fotosyntézy může být signálem pro změnu „vzorce“ rozdělování asimilovaného uhlíku po rostlině listech (Ševčíková et al., 2017). Navíc za podmínek *in vitro* jsem se snažila jímat floémové exudáty pouze z rostlin kultivovaných po dobu cca 8 týdnů, s „normálním vzrůstem“ a bez hlíz. O transportu sacharidů floémem mj. rozhoduje síla sinku, která v případě těchto rostlin, které neměly tendenci tuberizovat pravděpodobně nebyla významná. Pro ověření síly sinku by bylo potřeba stanovit i množství sacharidů ve stolonu, nicméně vzhledem k tomu, že rostliny D69 stolony za podmínek SD ani LD téměř netvořily (získaný materiál z LD byl přednostně použit na analýzu transkriptů), nebylo možné tuto analýzu provést. Navíc u rostlin D69 kultivovaných *in vitro* je méně vyvinutý kořenový systém, tudíž je zeslabena síla dalšího důležitého podzemního sinku.

V předchozích experimentech Ševčíková et al. (2017) u cca 6týdenních fotoautotrofních *in vitro* rostlin zjistili vyšší množství rozpustných sacharidů v kořenech rostlin D69 proti kontrole. Nabízí se otázka, jak intenzivní je transport sacharidů z listů u rostlin kultivovaných kratší dobu, a zda při delší kultivaci intenzita transportu neustává, jelikož dále klesá síla sinku. Otázkou však zůstává, proč by tedy rostliny D69 nevyužily zvýšené množství sacharidů v listech k investici do růstu své nadzemní části. Bylo by zajímavé zmapovat transport sacharidů u rostlin D69 a Lada během růstu rostlin. Rovněž je vhodné brát v úvahu možnost odlišného zastoupení vodivých pletiv u rostlin D69 proti rostlinám Lada. Rozdílné množství transkriptu transkripčního faktoru G2 v rostlinách Lada a D69 by mohlo naznačovat rozdílné zastoupení pletiv. Stanovit zastoupení vodivých pletiv u rostlin D69 a Lada, byl jeden z dílčích cílů mé práce. Odebrala jsem vzorky pro následné zhotovení anatomických řezů, nicméně jsem z časových důvodů tento cíl nenaplnila (diskutováno i dále).

Hladina transkriptů StSUT1 a StSUT4

Dále jsem se rozhodla stanovit hladinu transkriptů sacharózových transportérů *StSUT1* a *StSUT4*, a to jak ve zdrojových pletivech, tak i ve stolonu. Důvody zvolení těchto transkriptů byly následující. O sacharidových transportérech se uvažuje jako o dalších možných senzorech zahrnutých v sacharidové signalizaci (Kühn and Grof, 2010). *StSUT1* je zásadní pro dálkový transport sacharózy u rostlin bramboru (a to zejména ve zdrojových pletivech) a potlačení exprese genu *StSUT1* vedlo k defektům v nakládání do floému (Kuhn et al., 1996; Riesmeier et al., 1994). Dále snížená hladina exprese *StSUT4* vedla u striktně krátkodenních rostlin *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* mj. k vyšší produkci hlíz a tuberizaci za neinduktivních podmínek dlouhého dne. Navíc *StSUT4* pravděpodobně negativně ovlivňuje expresi *StSUT1* (Chincinska et al., 2008). Hladina transportérů je regulována především na úrovni transkripce a některé studie ukazují, že odpovídající transkripty jsou pohyblivé floémem (He et al., 2008). Na tyto dva transportéry jsem se zaměřila, jelikož protein *StSUT1* má vyšší transportní aktivitu pokud vytvoří funkční homodimér (Krugel et al., 2008, 2009), nicméně byla ale také prokázána protein-proteinová interakce mezi *StSUT1* a *StSUT4* (Reinders et al., 2002). *StSUT4* má roli v sinku při vykládání z floému, ale jeho koncentrace nebývají vysoké a je mu přisuzována spíše regulační úloha.

Za podmínek LD jsem našla signifikantně vyšší hladinu transkriptů *StSUT1* u rostlin D69 proti rostlinám Lada (graf 18A), nicméně za podmínek SD byly hladiny u rostlin D69 a Lada srovnatelné (graf 18B). Nižší transport sacharidů floémem

u mutantních rostlin v listech, nelze tedy zřejmě přisuzovat změnám v expresi *StSUT1*, naopak je možné, že zvýšená hladina sacharidů v listu vedla k indukci exprese *StSUT1*. Navíc vyšší hladinu transkriptu v listech za podmínek LD u rostlin D69 nelze pravděpodobně přisuzovat regulaci prostřednictvím *StSUT4* (Chincinska et al., 2008), jelikož hladina transkriptů *StSUT4* je za podmínek LD srovnatelná u rostlin D69 i Lada (graf 18A). A ačkoliv je za podmínek SD v listech rostlin D69 signifikantně nižší hladina transkriptů *StSUT4* proti Lada (graf 18B), hladina transkriptů *StSUT1* je u rostlin D69 a Lada srovnatelná (graf 18B).

Vztah transportu sacharidů po rostlině k tuberizačnímu potenciálu byl potvrzen tím, že *StBEL5*, známý tuberizační regulátor, indukuje pozitivně expresi *StSUT1* ve stolonu, a tak zvyšuje sílu sinku (Sharma et al., 2016). Naproti tomu potlačení exprese *StSUT1* vedlo k redukovanému výnosu hlíz v časně fázi vývoje a výsledky experimentů naznačily klíčovou roli *StSUT1* při vykládání z floému v časných fázích tuberizace (Viola et al., 2001). Ve stolonu jsem sice zaznamenala trend vyšší hladiny transkriptů *StBEL5* za podmínek LD u rostlin D69 proti rostlinám Lada (graf 13), nicméně hladina transkriptů *StSUT1* byla ve stolonu srovnatelná (graf 19). Hladina transkriptů *StSUT4* byla ve stolonu mírně vyšší u rostlin D69 proti kontrole (graf 19), otázkou zůstává, jakou má *StSUT4* úlohu ve stolonu.

Pohyb transkriptů sacharózových transportérů floémem byl nalezen u několika druhů rostlin včetně bramboru (He et al., 2008; Roney et al., 2007; Deeken et al., 2008). S tím jsou ve shodě výsledky mých experimentů. Ve floému jsem detekovala transkripty *StSUT1* a *StSUT4* u rostlin D69 i Lada. Mezi hladinami těchto transkriptů ve floému jsem však u rostlin D69 a Lada nenalezla žádné významné rozdíly (graf 20A, 20B).

5.4. Mobilní transkripty

Hladina sacharidů a jejich tok odráží účinnost fotosyntézy, takže sacharidová bilance může být spojena s genetickou odchylkou u linie D69. Na druhé straně jsou právě sacharidy samy o sobě důležité signální molekuly. A dále, tok sacharidů určuje tok „floémové superdálnice“ a tím směr i rychlost toku informačních signálních molekul, které jsou floémem transportovány (přehledně např. v Smeekens and Hellmann, 2014, Rolland et al., 2006). Ševčíková et al. (2017) navrhuje, že změny v distribuci sacharidů po těle rostliny mohou indukovat změny v transportu nebo produkci dalších mobilních signálů, které jsou transportovány floémem. Toto tvrzení podporují výsledky v naší laboratoři prováděného experimentu s mutantními rostlinami D69, kdy urychlení nástupu tuberizace bylo spojeno se změnou v distribuci sacharidů ve prospěch báze stonku

a zároveň se měnila míra exprese vybraných mobilních signálů v listech (Ševčíková et al., 2017).

Zaměřila jsem se tedy na další aspekt regulace tuberizace, která s předchozími úzce souvisí – produkci mobilních signálů v listu, jejich transport floémem a změny hladin cílových transkriptů ve stolonu. Nejnovější výzkumy ukazují, že právě mobilní signály (transkripty, proteiny) transportované z listů na dlouhou vzdálenost floémem sehrávají význačnou roli v iniciaci tvorby hlíz, např. *StBEL5* mRNA (Banerjee et al., 2006), protein *StSP6A* (Navarro et al., 2011). Jak už bylo řečeno, transport mobilního signálu je závislý na toku floémem, a tedy distribuci sacharidů po rostlině. Z důvodu snahy vyhodnotit vztah toku sacharidů floémem a transportu mobilních signálů, jsem floémové exudáty, které jsem použila pro následnou detekci vybraných mobilních transkriptů účastnících se regulace tuberizace, pokud to bylo možné, najímala ve stejný čas, za stejných podmínek a ze stejných rostlin, které jsem použila pro stanovování fotosyntetických charakteristik a sacharidové bilance.

Na základě publikovaných prací jsem pro stanovení normalizované hladiny transkriptů v listech, stolonu a floému vybrala následující geny: *StBEL5*, *StPOTH1* (Banerjee et al., 2006, Mahajan et al., 2012), *StBEL11*, *StBEL29* (Ghate et al., 2017), *StSP6A* (Navarro et al., 2011). Otázkou bylo, zda, a pokud ano, do jaké míry se lišily expresní hladiny vybraných transkriptů mutantní linie D69 a rostlin Lada za různých testovaných podmínek. A následně bylo potřeba tato zjištění dát do souvislosti se zjištěným obsahem sacharidů v najímaných exudátech, tedy množstvím sacharidů za daných podmínek transportovaných floémem.

Analýzu hladiny transkriptů jsem prováděla pomocí metody qRT-PCR. Účinnost amplifikace molekul byla v případě transkriptů *StBEL5* a *StPOTH1* vyšší, než je hodnota teoretického maxima, kolem hodnoty 2,5. Je tedy třeba brát počet kopií pro dané transkripty jako mírně nadhodnocený. I u ostatních transkriptů byla hodnota efektivity v rozmezí 1,9 – 2,2. Zvýšená účinnost amplifikace byla pravděpodobně způsobena nepřesným namícháním ředící řady, kterou jsem používala při všech experimentech, abych zajistila srovnatelnost experimentů. Tato chyba byla tedy víceméně systematická a po normalizaci na počet kopií mRNA pro polyubikvitin došlo k jejímu odstranění, což umožňuje srovnání mezi rostlinami D69 a rostlinami Lada. Pro upřesnění výsledků by bylo samozřejmě vhodné experimenty zopakovat za použití nové ředící řady.

Pro správné vyhodnocení výsledků bylo nezbytné vybrat vnitřní standard, tzv. referenční transkript. Jako referenční transkript pro list a stolon jsem na základě publikované práce Ševčíková et al. (2017) použila transkript *polyubikvitin (UBI)* a *eukaryotický elongační faktor 1 alfa (eEF1a)*. Vzhledem k jejich srovnatelným hladinám jsem dále používala jako referenční transkript pro list i stolon pouze *UBI*. Zvolení vhodného referenčního transkriptu ve floému bylo problematictější. Nejprve jsem jako referenční transkript zvolila transkript transkripčního faktoru *G2*. *G2* byl určen jako floém specifický marker, který se účastní regulace diferenciaci vodivých pletiv (Zhao et al., 2005). Provedla jsem semi-kvantitativní PCR pro zjištění přítomnosti tohoto transkripčního faktoru ve floému rostlin bramboru. Ve floému jsem touto metodou transkript *G2* detekovala u rostlin D69 stejně jako u rostlin Lada. Semi-kvantitativní metodu jsem shledala jako běžně používanou metodu pro detekování transkriptu *G2* jako floémového markeru u bramboru (Bhogale et al., 2014, Banerjee et al., 2006), ale i *A. thaliana* (Bonke et al., 2003). Následně jsem na základě výsledků qRT-PCR zjistila, že transkript *G2* nelze v mém případě použít jako referenční, jelikož jsem ho u některých rostlin ve floému nedetekovala vůbec, v jiných případech byla jeho hladina na hranici detekce nebo byla odečtena hodnota *Ct* dimérů primerů. Vzhledem k regulační funkci transkripčního faktoru *G2* při diferenciaci floému je možné, že v plně diferenciovaných pletivech rostlin není vyšší množství tohoto transkripčního faktoru potřeba. Je také možné, že podmínky amplifikace *G2* pomocí kvantitativního PCR nebyly plně optimalizovány. Každopádně transkript s kolísajícím množstvím ve floému, často na hranici detekční schopnosti PCR, není vhodné používat jako referenční transkript (graf 11A). V literatuře jsem u bramboru nenalezla žádný transkript, který bych mohla použít jako vnitřní standard při kvantifikacích metodou qRT-PCR. U dýně se jako vhodní kandidáti jeví transkripty *CsNZF* a *CsMYB77* (Lin et al., 2009), nicméně pokud existují pro tyto geny homology u bramboru, neexistují žádné informace o jejich expresním profilu. Také u *A. thaliana* byl recentně nalezen floém specifický transkript *NDR1/HIN1-like26 (NHL26)*, ale ani v tomto případě není homolog u bramboru známý (Vilaine et al., 2013).

Pro další analýzy floému u bramboru by bylo dobré zjistit, zda je některý z transkriptů možné použít jako floém specifický marker, případně najít nový floém specifický transkript se stabilní mírou exprese. Během experimentování jsem zaznamenala, že transkript *polyubikvitinu (UBI)* je ve floému dobře detekovatelný se stabilní mírou exprese. Při testování *UBI* jako vhodného referenčního transkriptu

pro floém jsem vyhodnotila množství kopií testovaných transkriptů dle relativních ředících řad připravených z cDNA z listu, a to ve vzorcích listu, ve floému a ve stolonu za podmínek LD (graf 11A, B, C, D, E) a vypočítala jsem poměry mediánů list/floém a stolon/floém (tab.13). Ukázalo se, že při hodnocení počtu kopií, *polyubikvitin* vykazuje srovnatelné hodnoty u rostlin Lada i D69 (graf 11B) (vztaženo na množství izolované RNA vložené do reverzní transkripce) i srovnatelné poměry mediánů list/floém u rostlin Lada a D69 (tab. 13), čímž transkript *UBI* splnil běžně používaná kritéria pro použitelný referenční transkript.

Současně jsem zjistila, že i „nemobilní“ transkripty se vyskytovaly ve floému rostlin Lada i D69 (*RbcS2*, *StSP5G*) (graf 11C, 11D). Nicméně metoda qRT-PCR detekuje krátké úseky mRNA (cca 100–250 bp) a současně je velice citlivá. Detekce určitého transkriptu ve floému touto metodou tedy nezohledňuje jeho integritu a schopnost být translatován. Mobilní transkripty jsou obaleny RNA-vazebnými proteiny typu PTB, které stabilizují RNA během transportu floémem. Ostatní mRNA, jakkoliv ve floémové šťávě přítomné a detekovatelné, mohou být v různém stádiu degradace.

Následně jsem se rozhodla podívat na poměry mediánů list/floém u všech mnou sledovaných transkriptů (tab. 13). Porovnávala jsem poměry mediánů u jistě „nemobilních“ transkriptů *RbcS2* a *StSP5G* s poměry transkriptů, které jsou v literatuře potvrzené jako „mobilní“: *StBEL11*, *StBEL29* a *StPOTH1*. Poměry mobilního transkriptu *StBEL5* jsem nemohla do úvahy zahrnout, protože se mi nepodařilo tento transkript ve floému za podmínek LD detekovat, což celkovou interpretaci výsledků komplikovalo. Nicméně jelikož byly poměry „mobilních“ transkriptů nižší než poměry dvou předchozích (*RbcS2*, *StSP5G*), následně jsem srovnala i poměry dalších transkriptů, u kterých jsem zjistila rovněž nižší hodnotu tohoto poměru (tab. 13). Na základě této úvahy lze spekulovat, že i ostatní sledované transkripty (*StSP6A*, *StSUT1*, *StSUT4*) by mohly být aktivně transportovány.

Hladina transkriptů StBEL5, StBEL11, StBEL29 a StPOTH1

StBEL5 je transkripční faktor, jehož funkcí je přímo aktivovat tuberizaci a zároveň prostřednictvím vytvoření heterodiméru se svým interakčním partnerem *StPOTH1* amplifikovat signál jak vlastní, tak signál dalších důležitých molekul zahrnutých v tuberizaci, např. mnou vybrané *StSP6A*, *StBEL11* a *StBEL29* (Sharma et al., 2016). Exprese genů *StBEL5*, *StSP6A*, *StBEL11* a *StBEL29* probíhá v listech. Na dlouhou vzdálenost floémem do stolonu jsou transportovány transkripty *StBEL5*, *StBEL11* a *StBEL29* a protein *StSP6A*. Ve stolonu dochází k amplifikaci signálu

autoregulační smyčkou i k ovlivnění dalších komponent komplexní regulační sítě tuberizace (Sharma et al., 2016, Chen et al., 2004). Výsledky mých experimentů ukazují signifikantně vyšší hladinu transkriptů *BEL5* za podmínek LD v listech rostlin D69 proti rostlinám Lada a trend vyšší hladiny transkriptů jeho interakčního partnera *StPOTH1* (graf 12A). Tyto výsledky jsou ve shodě s experimenty, kdy vyšší exprese *StBEL5* vedla k časnějšímu nástupu tuberizace a vyššímu výnosu hlíz (Sharma et al., 2016), avšak neshodují se s výsledky Ševčíková et al. (2017), které ukazují signifikantně nižší hladinu transkriptu *StBEL5* u *in vitro* kultivovaných rostlin D69 proti rostlinám Lada. Hladina transkriptů *StBEL5* v listech byla za podmínek SD výrazně navýšena proti podmínkám LD. Na základě těchto výsledků a na základě literatury jsem předpokládala, že bude za podmínek SD docházet ke zvýšenému transportu mobilního transkriptu *StBEL5* do stolonu (Banerjee et al., 2006, Cho et al., 2015), což neodpovídá mým výsledkům. Celkovou interpretaci výsledků znesnadňuje fakt, že se mi nepodařilo za podmínek LD kvůli technickým problémům detekovat transkript *StBEL5* ve floému. Za podmínek SD jsem zjistila trend nižší hladiny transkriptů *StBEL5* ve floému rostlin D69 oproti rostlinám Lada (graf 14B). Při úvaze o transportu nejen transkriptů *BEL*, ale i dalších aktivně transportovaných transkriptů je potřeba vzít v úvahu proteiny, které obalují RNA ve floému a regulují její stabilitu a transport, v tomto případě *StPTB1* a *StPTB6*. Tyto proteiny zajišťují pohyb, stabilitu a lokalizaci transkriptů *BEL* (Cho et al., 2015). Proto by bylo zajímavé u rostlin D69 zjistit expresní profil genů, které tyto proteiny kódují.

U rostlin D69 jsem ve stolonu zaznamenala trend vyšší hladiny transkriptů *StBEL5* a *StPOTH1* (graf 13). Situace v listech a ve stolonu za podmínek LD odpovídala zvýšené frekvenci tuberizace u mutantních rostlin D69. Vzhledem k tomu, že rostliny D69 téměř netvořily stolony, nepodařilo se mi odebrat stolon z rostlin kultivovaných za podmínek SD, takže je otázkou, zda i za těchto podmínek by výsledky ukazovaly trend vyšší hladiny transkriptů *StBEL5* u rostlin D69 oproti rostlinám Lada. Tato možnost není vyloučena vzhledem k tomu, že heterodimér *BEL5-POTH1* indukuje expresi *StBEL5* ve stolonu rostlin (Lin et al., 2013) a že za podmínek LD jsem ve stolonu zaznamenala trend zvýšené hladiny transkriptů *StBEL5* i *StPOTH1* (graf 13) u rostlin D69 proti kontrole. V listech se produkují další mobilní transkripty transkripčních faktorů *BEL*, tj. *StBEL11* a *StBEL29*, které působí antagonisticky k *StBEL5*, tzn. jsou na základě experimentů považovány za supresory tuberizace. Nicméně u *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* dochází k jejich akumulaci a zvýšenému transportu stejně jako v případě transkriptu *StBEL5*

za indukčních podmínek SD (Ghate et al., 2017). Tomu odpovídala situace v listech (2-4násobné navýšení za SD u rostlin D69 i Lada) (graf 12B, 12D), nikoliv však ve floému (graf 14A, 14B). Je zajímavé, že v rozporu s mým očekáváním nemají ve floému hladiny transkriptů *StBEL11* a *StBEL29* shodné tendence navýšení/snížení u rostlin D69 proti kontrole, tzn. hladina transkriptů *StBEL11* je ve floému za podmínek LD signifikantně vyšší u rostlin D69 proti Lada, zatímco v případě transkriptu *BEL29* jsem vypožadovala opačný trend. Zajímavé také je, že ačkoliv se jedná o represory tuberizace, za podmínek LD jsem ve stolonu našla vyšší hladinu transkriptů *StBEL11* a *StBEL29* u rostlin D69 proti kontrole (graf 13). Nicméně tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky experimentů Ghate et al. (2017), kdy při indukci tuberizace docházelo k navýšení obou zmínovaných transkriptů. Ghate et al. (2017) navrhuje, že transkripty *StBEL11* a *StBEL29* působí represivně na tuberizaci a na rozdíl od *StBEL5* se uplatňují v odlišné vývojové fázi tvorby stolonu, nebo na odlišné typy buněk v subapikální oblasti a společně s *StBEL5* mohou tyto transkripty účinně koordinovat přechod od stolonu k hlíze. Je možné, že jelikož jsem zaznamenala trend navýšení transkriptů u *StBEL5*, *StBEL11* i *StBEL29*, výsledná rovnováha ve stolonu nebyla narušena.

Hladina transkriptů *StSP6A* a *StSP5G*

StSP6A je jedním z hlavních mobilních signálů, který se účastní regulace iniciace tuberizace. Nadměrná exprese genu *StSP6A* způsobila tuberizaci za neinduktivních podmínek LD u striktně krátkodenních rostlin *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* (Navarro et al., 2011). S tím jsou v souladu výsledky Ševčíková et al. (2017), kteří stanovovali hladinu transkriptů *StSP6A* v listech rostlin D69 a Lada kultivovaných *in vitro* fotototrofně. Hladina transkriptů *StSP6A* byla signifikantně vyšší (6x) u rostlin D69 proti kontrole. Ve svých experimentech jsem zaznamenala za podmínek LD signifikantně vyšší hladinu *StSP6A* (6x) v listech rostlin D69 oproti Lada (graf 15A), nicméně za podmínek SD jsem zaznamenala opačný trend (graf 15B). Zajímavé bylo, že hodnota hladiny transkriptů *StSP6A* za induktivních podmínek SD (graf 15B) u kontrolních rostlin Lada byla srovnatelná s hladinou transkriptů rostlin D69 za podmínek LD (graf 15A). To naznačuje, že za podmínek LD se u rostlin D69 v listech vytváří dostatečné množství „mobilního signálu“, který zprostředkovává zahájení tuberizace. Navíc jsem v listech rostlin D69 za podmínek LD našla signifikantně nižší hladinu transkriptu *StSP5G* (graf 15A), který je negativním regulátorem exprese genu *StSP6A* v listech a je řízen CONSTANS (Abelenda et al., 2016) a rovněž signifikantně vyšší hladinu *StBEL5* a *StPOTH1* (v listech i ve stolonu), jejichž produkty indukují expresi genu *StSP6A* ve stolonu (Hannapel et al., 2017; Sharma et al., 2016). To je v souladu s tím,

že za podmínek LD jsem ve stolonu rovněž zaznamenala vyšší hladinu transkriptů *StSP6A* u rostlin D69 proti rostlinám Lada (graf 16). Ačkoliv se předpokládá, že dostatečný tuberigenní signál transportovaný floémem a regulující iniciaci tuberizace ve stolonu je protein StSP6A, není vyloučeno, že jeho transkript se floémem transportuje také. U *A.thaliana* je protein FT (homolog StSP6A) transportovaný floémem dostatečný signál pro iniciaci kvetení (Mathieu et al., 2007), nicméně literatura nevyvrací, že transkript tohoto genu je také součástí florigenního signálu. Li et al. (2009) se podařilo pohyb mRNA *FT* detekovat. Vzhledem k podobnosti „florigenního“ a „tuberigenního“ signálu (Abelenda et al., 2014) je možné, že i transkript genu *StSP6A* je součástí tuberigenního signálu. Tuto hypotézu podporují výsledky mých experimentů, kdy jsem ve floému rostlin D69 a Lada transkript genu *StSP6A* detekovala v relativně hojné míře.

5.5. Tok sacharidů a mobilní transkripty

Na základě dosažených výsledků je relativně obtížné jednoznačně určit vztah mezi silou floémového toku, mobilitou transkriptů a zvýšeným tuberizačním potenciálem mutantních rostlin, jak bylo formulováno ve výchozí hypotéze. Síla floémového toku, vyjádřená jako množství sacharidů najímaných za jednotku času, byla u rostlin D69 proti rostlinám Lada nižší, nicméně celkové množství RNA po izolaci z najímané floémové šťávy bylo srovnatelné mezi rostlinami D69 a Lada. Jestliže jsem zjistila, že většina sledovaných mobilních transkriptů vykazuje srovnatelnou nebo mírně vyšší hladinu ve floému rostlin D69, lze spekulovat o tom, že množství transkriptů transportovaných do místa určení, tj. i do stolonu bude, nezávisle na síle floémového toku srovnatelné, tzn. že předpokládaný těsný vztah mezi silou floémového toku a mobilitou transkriptů nemusí existovat. Pro ověření této hypotézy by bylo nutné experiment zopakovat a např. zahrnout vnitřní standard, tj. cizorodý transkript o známé koncentraci, a zhodnotit jeho ztráty během zpracování vzorků.

Další nesnáz pro ověření hypotézy pramenila z hodnocení experimentu za podmínek SD. Na rozdíl od podmínek LD byla síla floémového toku slabší, což bylo zřejmě způsobeno provedením experimentu v pozdní sezóně, kdy rostliny již mohly přecházet do senescence. Pro optimální provedení experimentu za podmínek SD by bylo vhodné použít kultivační box s kontrolovatelnými podmínkami, což se nepodařilo s ohledem na nedostatek těchto prostorů zrealizovat. Pro lepší hodnotitelnost vzorků a příp. rozdílů mezi genotypy, by bylo také vhodné jímat floémové exudáty z více listů najednou.

Je nutné dále brát v potaz, že síla floémového toku definovaná jako množství sacharidů transportovaných za jednotku času nepopisuje jednoznačně rychlost floémového toku. Pro sledování rychlosti floémového toku by bylo možné použít např. fluorescenční barvičku CFDA (carboxyfluorescein diacetate) jako „tracer“, která je využívána v testech kontinuity floému u *A.thaliana* (Melnik 2017), a změny pohybu fluorescenční značky floémem sledovat v čase pod lupou. Síla floémového toku může být také ovlivněna mocností floému. Porovnání zastoupení vodivých pletiv floému u rostlin Lada a D69 (v původním plánu řešení práce) je ztíženo tím, že *Solanaceae* mají bikolaterální cévní svazek, který je na řezu obtížně odlišitelný od okolních parenchymatických buněk. Použití CFDA by pravděpodobně vyřešilo i tento problém.

Z dat vyplývá, že sledované transkripty vykazovaly u rostlin D69 navýšené hladiny i ve stolonu. Otázkou zůstává, do jaké míry jsou za zvýšený tuberizační potenciál zodpovědné změny hladin těchto transkriptů v listech a/nebo jejich mobilita. Odpovědět na tuto otázku by mohly experimenty s roubováním, které se však v naší laboratoři dosud nepodařilo úspěšně provést.

6. Závěr

- ❖ Zjistila jsem, že mutantní rostliny D69 ve srovnání s rostlinami Lada:
 - mají nižší fluorescenci chlorofylu a, což naznačuje zasažení primární fáze fotosyntézy
 - mají srovnatelné rychlosti čisté fotosyntézy, takže zřejmě zdárně kompenzovaly zásah do primární fáze fotosyntézy
 - obsahují srovnatelné množství fotosyntetických pigmentů (chlorofylu a, chlorofylu b, karotenoidů)
 - vykazují trend vyššího množství antokyanů v listech, což může poukazovat na zvýšenou antioxidační aktivitu v listech
 - obsahují vyšší množství celkových rozpustných sacharidů v listech za všech testovaných podmínek, vztaženo na listovou plochu i na specifickou plochu listu
 - mají slabší floémový tok za všech testovaných podmínek, kdy síla toku je vyjádřena jako množství sacharidů za jednotku času, vztaženo na listovou plochu i na specifickou listovou plochu
 - mají za podmínek LD vyšší hladiny transkriptů *StBEL5*, *StSP6A*, *StPOTH1* v listu i ve stolonu
 - mají za podmínek LD nižší hladinu exprese represoru *StSP5G* v listu
 - i přes nižší sílu floémového toku nevykazují na základě předběžných závěrů pokles mobility vybraných transkriptů

- ❖ Na základě dosažených výsledků se zdá, že nemusí existovat očekávaný přímý vztah mezi silou floémového toku, mobilitou vybraných transkriptů a zvýšeným tuberizačním potenciálem mutantních rostlin.

7. Seznam použité literatury:

- Abelenda, J. A., Cruz-Oró, E., Franco-Zorrilla, J. M., & Prat, S. (2016). Potato StCONSTANS-like1 Suppresses Storage Organ Formation by Directly Activating the FT-like StSP5G Repressor. *Current Biology*, **26**, 872–881.
- Abelenda, J. A., Navarro, C., & Prat, S. (2011). From the model to the crop: Genes controlling tuber formation in potato. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**, 287–2
- Abelenda, J. A., Navarro, C., & Prat, S. (2014). Flowering and tuberization: A tale of two nightshades. *Trends in Plant Science*, **19**, 115–122.
- Aksenova, N. P., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Sergeeva, L. I., & Romanov, G. A. (2012). Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, **59**, 451–466.
- Ayre, B. G. (2011). Membrane-transport systems for sucrose in relation to whole-plant carbon partitioning. *Molecular Plant*, **4**, 377–394.
- Banerjee, A. K., Chatterjee, M., Yueyue, Y., Suh, S.-G., Miller, W. A., & Hannapel, D. J. (2006). Dynamics of a Mobile RNA of Potato Involved in a Long-Distance Signaling Pathway. *Plant Cell*, **18**, 3443–3457.
- Banerjee, A. K., Lin, T., & Hannapel, D. J. (2009). Untranslated Regions of a Mobile Transcript Mediate RNA Metabolism. *Plant Physiology*, **151**, 1831–1843.
- Batutis, E. J., & Ewing, E. E. (1982). Far-Red Reversal of Red Light Effect during Long-Night Induction of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Tuberization. *Plant Physiology*, **69**, 672–674.
- Bhogale, S., Mahajan, A. S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V., & Banerjee, A. K. (2014). MicroRNA156: A Potential Graft-Transmissible MicroRNA That Modulates Plant Architecture and Tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiology*, **164**, 1011–1027.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mähönen, A. P., Hauser, M.-T., & Helariutta, Y. (2003). APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, **426**, 181–186.
- Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martínez, J. L., & Prat, S. (2000). Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant Journal*, **22**, 247–256.
- Chen, H., Banerjee, A. K., & Hannapel, D. J. (2004). The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1*. *Plant Journal*, **38**, 276–284.
- Chen, H., Rosin, F. M., Prat, S., & Hannapel, D. J. (2003). Interacting Transcription Factors from the Three-Amino Acid Loop Extension Superclass Regulate Tuber Formation. *Plant Physiology*, **132**, 1391–1404.
- Chincinska, I. A., Liesche, J., Krugel, U., Michalska, J., Geigenberger, P., Grimm, B., & Kühn, C. (2008). Sucrose Transporter StSUT4 from Potato Affects Flowering, Tuberization, and Shade Avoidance Response. *Plant Physiology*, **146**, 515–528.

- Cho, S. K., Sharma, P., Butler, N. M., Kang, I. H., Shah, S., Rao, A. G., & Hannapel, D. J. (2015). Polypyrimidine tract-binding proteins of potato mediate tuberization through an interaction with StBEL5 RNA. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 6835–6847.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156–159.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., ... Coupland, G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science*, **316**, 1030–1033.
- Deeken, R., Ache, P., Kajahn, I., Klinkenberg, J., Bringmann, G., & Hedrich, R. (2008). Identification of Arabidopsis thaliana phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex datasets of microarray experiments. *Plant Journal*, **55**, 746–759.
- Duchoslav, M., & Fischer, L. (2015). Parallel subfunctionalisation of PsbO protein isoforms in angiosperms revealed by phylogenetic analysis and mapping of sequence variability onto protein structure. *BMC Plant Biology*, **15**, 133.
- Dutt, S., Manjul, A. S., Raigond, P., Singh, B., Siddappa, S., Bhardwaj, V., ... Kardile, H. B. (2017). Key players associated with tuberization in potato: potential candidates for genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology*, **37**, 942–957.
- FISCHER, Lukáš. Tuberizace bramboru (*Solanum tuberosum* L.). Praha, 2005. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta. Katedra genetiky a mikrobiologie. Vedoucí práce Prof. RNDr. Zdeněk Opatrný, CSc.
- Fischer, L., Lipavská, H., Hausman, J. F., & Opatrný, Z. (2008). Morphological and molecular characterization of a spontaneously tuberizing potato mutant: an insight into the regulatory mechanisms of tuber induction. *BMC Plant Biology*, **8**.
- Ghate, T. H., Sharma, P., Kondhare, K. R., Hannapel, D. J., & Banerjee, A. K. (2017). The mobile RNAs, StBEL11 and StBEL29, suppress growth of tubers in potato. *Plant Molecular Biology*, **93**, 563–578.
- Gibson, S. I. (2005). Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 93–102.

- Guo, J. L., Yu, C. L., Fan, C. Y., Lu, Q. N., Yin, J. M., Zhang, Y. F., & Yang, Q. (2010). Cloning and characterization of a potato TFL1 gene involved in tuberization regulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **103**, 103–109.
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Strasser, R. J., Woong, Y. J., & Park, S. W. (2012). Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Physiology and Biochemistry*, **58**, 182–194.
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Strasser, R. J., Yu, J. W., & Park, S. W. (2013). Evaluation of abiotic stress tolerance in transgenic potato plants with reduced expression of PSII manganese stabilizing protein. *Plant Science*, **198**, 7–16.
- Ham, B.-K., & Lucas, W. J. (2014). The angiosperm phloem sieve tube system: A role in mediating traits important to modern agriculture. *Journal of Experimental Botany*, **65**, 1799–1816.
- Hannapel, D. J. (2013). A perspective on photoperiodic phloem-mobile signals that control development. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 295.
- Hannapel, D. J., Sharma, P., Lin, T., & Banerjee, A. K. (2017). The Multiple Signals That Control Tuber Formation. *Plant Physiology*, **174**, 845–856.
- Hanzawa, Y., Money, T., & Bradley, D. (2005). A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **102**, 7748–7753.
- Harig, L., Beinecke, F. A., Oltmanns, J., Muth, J., Müller, O., Rüping, B., ... Noll, G. A. (2012). Proteins from the FLOWERING LOCUS T-like subclade of the PEBP family act antagonistically to regulate floral initiation in tobacco. *Plant Journal*, **72**, 908–921.
- He, H., Chincinska, I., Hackel, A., Grimm, B., & Kühn, C. (2008). Phloem Mobility and Stability of Sucrose Transporter Transcripts. *Open Plant Science Journal*, **2**, 1–14.
- Jackson, S. D. (1999). Multiple Signaling Pathways Control Tuber Induction in Potato. *Plant Physiology*, **119**, 1–8.
- Jackson, S. D. (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*, **181**, 517–531.
- Jackson, S. D., Heyer, A., Dietze, J., & Prat, S. (1996). Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant Journal*, **9**, 159–166.
- Jaeger, K. E., Graf, A., & Wigge, P. A. (2006). The control of flowering in time and space. *Journal of Experimental Botany*, **57**, 3415–3418.
- Jarillo, J. A., & Piñeiro, M. (2011). Timing is everything in plant development. The central role of floral repressors. *Plant Science*, **181**, 364–378.
- King, R. W., & Zeevaert, J. A. D. (1974). Enhancement of Phloem Exudation from Cut Petioles by Chelating Agents. *Plant Physiology*, **53**, 96–103.
- Kobayashi, Y., & Weigel, D. (2007). Move on up, it's time for change - Mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes and Development*, **21**, 2371–

- Koda, Y., & OKazawa, Y. (1983). Characteristic Changes in the Levels of Endogenous Plant Hormones in Relation to the Onset of Potato Tuberization. *Japanese Journal of Crop Science*, **52**, 592–597.
- Krügel, U., & Kühn, C. (2013). Post-translational regulation of sucrose transporters by direct protein–protein interactions. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 237)
- Krugel, U., Veenhoff, L. M., Langbein, J., Wiederhold, E., Liesche, J., Friedrich, T., ... Kuhn, C. (2008). Transport and Sorting of the *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter SUT1 Is Affected by Posttranslational Modification. *Plant Cell*, **20**, 2497–2513.
- Krugel, U., Veenhoff, L. M., Langbein, J., Wiederhold, E., Liesche, J., Friedrich, T., ... Kühn, C. (2009). Transport and Sorting of the *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter SUT1 Is Affected by Posttranslational Modification: Correction (vol 20, pg 2497, 2008). *Plant Cell*, **21**, 4059–4060.
- Kühn, C., Hajirezaei, M. R., Fernie, A. R., Roessner-Tunali, U., Czechowski, T., Hirner, B., & Frommer, W. B. (2003). The sucrose transporter StSUT1 localizes to sieve elements in potato tuber phloem and influences tuber physiology and development. *Plant Physiology*, **131**, 102–113.
- Kuhn, C., Quick, W. P., Schulz, A., Riesmeier, J. W., Sonnewald, U., & Frommer, W. B. (1996). Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell and Environment*, **19**, 1115–1123.
- Kühn, C., & Grof, C. P. (2010). Sucrose transport of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**, 287–298.
- Li, C., Zhang, K., Zeng, X., Jackson, S., Zhou, Y., & Hong, Y. (2009). A cis Element within Flowering Locus T mRNA Determines Its Mobility and Facilitates Trafficking of Heterologous Viral RNA. *Journal of Virology*, **83**, 3540–3548.
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.
- Liesche, J., Krügel, U., He, H., Chincinska, I., Hackel, A., & Kühn, C. (2011). Sucrose transporter regulation at the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. *Journal of Plant Physiology*, **168**, 1426–1433.
- Lin, M.-K., Lee, Y.-J., Lough, T. J., Phinney, B. S., & Lucas, W. J. (2009). Analysis of the Pumpkin Phloem Proteome Provides Insights into Angiosperm Sieve Tube Function. *Molecular & Cellular Proteomics*, **8**, 343–356.

- Lin, M., Belanger, H., Lee, Y., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K., Xoconostle-ca, B., ... Lucas, W. J. (2007). FLOWERING LOCUS T Protein May Act as the Long-Distance Florigenic Signal in the Cucurbits. *Plant Cell*, **19**, 1488–1506.
- Lin, T., Sharma, P., Gonzalez, D. H., Viola, I. L., & Hannapel, D. J. (2013). The Impact of the Long-Distance Transport of a BEL1-Like Messenger RNA on Development. *Plant Physiology*, **161**, 760–772.
- Lough, T. J., & Lucas, W. J. (2006). Integrative plant biology: Role of Phloem Long-Distance Macromolecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 203–232.
- Mahajan, A., Bhogale, S., & Ho, I. (2012). The mRNA of a Knotted1-like transcription factor of potato is phloem mobile. *Plant Molecular Biology*, **79**, 595–608.
- Mancinelli, A. L., Yang, C.-P. H., Lindquist, P., Anderson, O. R., & Rabino, I. (1975). Photocontrol of Anthocyanin Synthesis. *Plant Physiology*, **55**, 251–257.
- Martin, A., Adam, H., Díaz-Mendoza, M., Zurczak, M., González-Schain, N. D., & Suárez-López, P. (2009). Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development*, **136**, 2873–2881.
- Martínez-García, J. F., Virgós-Soler, A., & Prat, S. (2002). Control of photoperiod-regulated tuberization in potato by the Arabidopsis flowering-time gene CONSTANS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15211–15216.
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., & Pospisek, M. (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*, **336**, 46–50.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., & Schmid, M. (2007). Export of FT Protein from Phloem Companion Cells Is Sufficient for Floral Induction in Arabidopsis. *Current Biology*, **17**, 1055–1060.
- Melnyk Ch.W. 2017, Monitoring Vascular Regeneration and Xylem connectivity in Arabidopsis thaliana, in Methods in molecular biology, vol. 1544, Xylem: Methods and Protocols, de Lucas and Etchells, eds., 91-102.
- Morris, W. L., Hancock, R. D., Ducreux, L. J. M., Morris, J. A., Usman, M., Verrall, S. R., ... Taylor, M. A. (2014). Day length dependent restructuring of the leaf transcriptome and metabolome in potato genotypes with contrasting tuberization phenotypes. *Plant, Cell and Environment*, **37**, 1351–1363.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473–497.
- Navarro, C., Abelenda, J. A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. A., Tamaki, S., Silva, J., ... Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, **478**, 119–122.
- Nelson, T., Tausta, S. L., Gandotra, N., & Liu, T. (2006). Laser microdissection of plant tissue: What You See Is What You Get. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 181–201.

- Pin, P. A., Benlloch, R., Bonnet, D., Wremerth-Weich, E., Kraft, T., Gielen, J. J. L., & Nilsson, O. (2010). An Antagonistic Pair of FT Homologs Mediates the Control of Flowering Time in Sugar Beet. *Science*, **330**, 1397–1400.
- Reinders, A., Schulze, W., Kühn, C., Barker, L., Schulz, A., Ward, J. M., & Frommer, W. B. (2002). Protein-Protein Interactions between Sucrose Transporters of Different Affinities Colocalized in the Same Eucleate Sieve Element. *Plant Cell*, **14**, 1567–1577.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., & Frommer, W. B. (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *EMBO Journal*, **13**, 1–7.
- Rodríguez-Falcón, M., Bou, J., & Prat, S. (2006). Seasonal control of tuberization in potato: Conserved Elements with the Flowering Response. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 151–180.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 675–709.
- Roney, J. K., Khatibi, P. A., & Westwood, J. H. (2007). Cross-Species Translocation of mRNA from Host Plants into the Parasitic Plant Dodder. *Plant Physiology*, **143**, 1037–1043.
- Sarkar, D. (2008). The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: An emerging synthesis. *Plant Cell Reports*, **27**, 1–8.
- Sarkar, D. (2010). Photoperiodic inhibition of potato tuberization: An update. *Plant Growth Regulation*, **62**, 117–125.
- Searle, I., & Coupland, G. (2004). Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO Journal*, **23**, 1217–1222.
- Ševčíková, H., Mašková, P., Tarkowská, D., Mašek, T., & Lipavská, H. (2017). Carbohydrates and gibberellins relationship in potato tuberization. *Journal of Plant Physiology*, **214**, 53–63.
- Sharma, P., Lin, T., & Hannapel, D. J. (2016). Targets of the StBEL5 Transcription Factor Include the FT Ortholog StSP6A. *Plant Physiology*, **170**, 310–324.
- Smeekens, S., & Hellmann, H. A. (2014). Sugar sensing and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 113.
- Suárez-López, P. (2013). A critical appraisal of phloem-mobile signals involved in tuber induction. *Frontiers in Plant Science*, **4**, 253.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., & Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, **410**, 1116–1120.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H. L., Yokoi, S., & Shimamoto, K. (2007). Hd3a Protein Is a Mobile Flowering Signal in Rice. *Science*, **316**, 1033–1036.

- Teo, C. J., Takahashi, K., Shimizu, K., Shimamoto, K., & Taoka, K. I. (2017). Potato tuber induction is regulated by interactions between components of a tuberigen complex. *Plant and Cell Physiology*, **58**, 365–374.
- Tetyuk, O., Benning, U. F., & Hoffmann-Benning, S. (2013). Collection and Analysis of Arabidopsis Phloem Exudates Using the EDTA-facilitated Method. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, **80**, e51111.
- Tiwari, S. B., Shen, Y., Chang, H.-C., Hou, Y., Harris, A., Ma, S. F., ... Ratcliffe, O. J. (2010). The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytologist*, **187**, 57–66.
- Turgeon, R., & Wolf, S. (2009). Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, **60**, 207–221.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., & Coupland, G. (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, **303**, 1003–1006.
- Vilaine, F., Kerchev, P., Clément, G., Batailler, B., Cayla, T., Bill, L., ... Dinant, S. (2013). Increased Expression of a Phloem Membrane Protein Encoded by NHL26 Alters Phloem Export and Sugar Partitioning in Arabidopsis. *Plant Cell*, **25**, 1689–1708.
- Viola, R., Roberts, A. G., Haupt, S., Gazzani, S., Hancock, R. D., Marmioli, N., ... Oparka, K. J. (2001). Tuberization in Potato Involves a Switch from Apoplastic to Symplastic Phloem Unloading. *Plant Cell*, **13**, 385–398.
- Vreugdenhil, D., & Sergeeva, L. I. (1999). Gibberellins and tuberization in potato. *Potato Research*, **42**, 471–481.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307–313.
- Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., & Weigel, D. (2005). Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. *Science*, **309**, 1056–1059.
- Xu, X., Lammeren, A. M. Van, Vermeer, E., & Vreugdenhil, D. (1998). The Role of Gibberellin , Absciscic Acid , and Sucrose in the Regulation of Potato Tuber Formation in Vitro. *Plant Physiology*, **117**, 575–584.
- Xu, X., Vreugdenhil, D., & Lammeren, A. A. M. (1998). Cell division and cell enlargement during potatoes tuber formation. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 573–582.
- Zeevaart, J. A. D. (2006). Florigen Coming of Age after 70 Years. *Plant Cell*, **18**, 1783–1789.
- Zhao, C., Craig, J. C., Petzold, H. E., Dickerman, A. W., & Beers, E. P. (2005). The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-Hypocotyl. *Plant Physiology*, **138**, 803–818.